FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

Année 1910 N°

THÈSE

POUR

LE DOCTORAT EN MÉDECINE

Présentée et soutenue le Mercredi 16 Mars 1910, à heure

PAR

Théophile BONDOUY A. O

Docteur en Médecine de la Faculté de Paris,
Pharmacien supérieur de l'Université de Paris,
Licencié ès Sciences naturelles,
Premier Prix, Médaille d'Argent, de l'École de Médecine de Rennes,
Professeur à l'Ecole de Médecine et de Pharmacie de Tours.

CHIMIE BIOLOGIQUE

DU

SCLEROSTOMUM EQUINUM

Travail des Laboratoires de Parasitologie et de Chimie Biologique
de la Faculté de Médecine de Paris.

Président : M. GAUTIER, Professeur.

Juges : MM. POUCHET, Professeur.
NICOLAS, Professeur.
DESGREZ, Agrégé.

Le Candidat répondra aux questions qui lui seront faites sur les diverses parties de l'enseignement médical

PARIS
ASSELIN ET HOUZEAU
Editeurs des *Archives de Parasitologie*

1910

FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

Doyen	M. LANDOUZY
Professeurs	MM.
Anatomie	NICOLAS
Physiologie	Ch. RICHET
Physique médicale	GARIEL
Chimie organique et chimie générale	GAUTIER
Parasitologie et histoire naturelle médicale	R. BLANCHARD
Pathologie et thérapeutique générales	BOUCHARD
Pathologie médicale	X. DEJERINE
Pathologie chirurgicale	LANNELONGUE
Anatomie pathologique	Pierre MARIE
Histologie	PRENANT
Opérations et appareils	HARTMANN.
Pharmacologie et matière médicale	POUCHET
Thérapeutique	GILBERT
Hygiène	CHANTEMESSE
Médecine légale	THOINOT
Histoire de la médecine et de la chirurgie	CHAUFFARD.
Pathologie expérimentale et comparée	ROGER
Clinique médicale	HAYEM DIEULAFOY DEBOVE LANDOUZY
Maladies des enfants	HUTINEL
Clinique des maladies mentales et des malad. de l'encéphale	Gilbert BALLET
Clinique des maladies cutanées et syphilitiques	GAUCHER
Clinique des maladies du système nerveux	RAYMOND
Clinique chirurgicale	Pierre DELBET. QUENU. RECLUS SEGOND
Clinique ophtalmologique	DE LAPERSONNE
Clinique des maladies des voies urinaires	ALBARRAN
Clinique d'accouchements	PINARD BAR RIBEMONT-DESSAIGNES
Clinique gynécologique	POZZI
Clinique chirurgicale infantile	KIRMISSON
Clinique thérapeutique	Albert ROBIN

Agrégés en exercice

MM.	MM.	MM.	MM.
AUVRAY	CUNEO	LAUNOIS	NOBECOURT
BALTHAZARD	DEMELIN	LECENE	OMBREDANNE
BRANCA	DESGREZ	LEGRY	POTOCKI
BEZANÇON(Fer.)	DUVAL (Pierre)	LENORMANT	PROUST
BRINDEAU	GOSSET	LŒPER	RENON
BROCA (André)	GOUGET	MACAIGNE	RICHAUD
BRUMPT	JEANNIN	MAILLARD	RIEFFEL, chef des travaux anatom.
CARNOT	JEANSELME	MARION	SICARD
CASTAIGNE	JOUSSET (André)	MORESTIN	ZIMMERN
CLAUDE	LABBE (Marcel)	MULON	
COUVELAIRE	LANGLOIS	NICLOUX	

Par délibération en date du 9 décembre 1798, l'Ecole a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui seront présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner aucune approbation ni improbation.

A LA MÉMOIRE DE MON PÈRE

A MA MÈRE

HOMMAGE FILIAL DE RESPECT ET D'AFFECTION

A MON FRÈRE

A MES PARENTS

A MES AMIS

A MON PRÉSIDENT DE THÈSE :

Monsieur le Professeur ARMAND GAUTIER

Membre de l'Institut et de l'Académie de Médecine

Commandeur de la Légion d'Honneur.

A Monsieur le Professeur RAPHAËL BLANCHARD

Membre de l'Académie de Médecine

Chevalier de la Légion d'Honneur

Hommage de ma bien vive reconnaissance.

AVANT-PROPOS

Les parasites animaux excrètent normalement des substances toxiques, presque toujours nuisibles à l'organisme de l'hôte. Parmi ces nombreux poisons, les uns représentent des produits de déchet, résultant de l'activité cellulaire du parasite ; les autres sont fabriqués dans un but approprié, le plus souvent un but de nutrition. Il faut ranger dans ce second groupe les poisons hémolytiques ; le parasite qui vit du sang de l'hôte élabore une substance toxique pour le globule rouge. Le stroma de l'hématie est désagrégé, puis, sous forme de solution ou d'émulsion très fine dans le plasma, est absorbé par les tissus du parasite.

On peut même affirmer que les constituants chimiques du globule rouge subissent, sous l'influence des sucs cellulaires du parasite, des séries de transformations plus ou moins profondes, avant de faire partie intégrante des tissus de ce parasite. Il en est de même des éléments du plasma. C'est ainsi que (nous le montrerons dans le cours de ce travail) la bilirubine du sang de cheval, si facile à déceler par le procédé Bierry et Ranc, ne se retrouve plus dans le sang de cheval absorbé par le *Sclerostomum equinum*.

Dans ces dernières années, le chapitre si intéressant des poisons hémolytiques élaborés par les parasites a attiré l'activité de nombreux chercheurs. Bien des coins restent encore obscurs, et c'est en vain, à notre avis, qu'on a cru résoudre en partie ces questions si ardues en créant des mots nouveaux (tels, par exemple, les mots lipoïde, hémolytique) qui ne servent qu'à masquer notre ignorance. C'est à la lumière de la Chimie biologique que le naturaliste expliquera peu à peu tous ces phénomènes complexes et nous ne craignons pas d'être taxé d'exagération en affirmant que bientôt,

pour être complet, le parasitologue devra être doublé d'un chimiste. Notre travail est un essai dans ce sens. L'idée nous en a été suggérée par les intéressantes publications du Dr Weinberg, de l'Institut Pasteur de Paris (1).

Après avoir contrôlé les résultats du Dr Weinberg, il nous a paru intéressant d'entreprendre la chimie du *Sclerostomum equinum*. Nous l'avouons, la tâche était ingrate, et, si nous avons établi quelques points, nous sommes convaincu qu'il reste beaucoup à faire.

Nous avons effectué nos recherches dans les laboratoires de M. le Professeur R. Blanchard (pour la partie hématologique) et de M. le Professeur Armand Gautier (pour la partie chimique). Nous avons été très sensible à la bienveillante hospitalité que nous avons reçue dans ces deux laboratoires et nous prions nos deux Maîtres d'agréer ici l'expression de notre plus profonde gratitude. Leur bonté à notre égard a été notre meilleur stimulant. M. le Professeur agrégé Maillard nous a prodigué ses conseils éclairés. Sa technique rigoureuse, son grand amour de la méthode dans toutes ses recherches ont été pour nous le meilleur exemple à imiter.

M. le Professeur agrégé Brumpt nous a toujours montré une amabilité exquise et nous a aidé dans nos recherches bibliographiques.

Nous adressons tous nos remerciements à M. Hildt, à M. Clausmann, préparateurs au laboratoire de Chimie biologique de M. le Professeur A. Gautier ; à M. le Dr Langeron, préparateur au laboratoire de Parasitologie de M. le Professeur R. Blanchard, pour tous les renseignements qu'ils nous ont communiqués.

Nous ne pouvons pas oublier M. le Dr Pagès, Directeur des Abattoirs de Vaugirard, qui nous a autorisé l'accès des échaudoirs et permis ainsi d'accumuler un grand nombre de parasites ; M. Romary, Vétérinaire principal en retraite, à Rennes, qui nous a honoré de sa sympathie et facilité nos premières recherches.

(1) Action de l'extrait de sclérostomes sur le sang de cheval. Travail du laboratoire de M. Metchnikoff. *Annales de l'Institut Pasteur*, 1907.

HISTORIQUE

Il nous a semblé indispensable, avant d'aborder notre sujet, d'esquisser à grands traits l'historique des substances toxiques élaborées par les parasites animaux. Une partie des documents qui vont suivre sont empruntés au magistral mémoire de M. le Professeur R. Blanchard (1).

En 1882, Mourson et Schlagdenhauffen ont établi que le liquide des Hydatides (*Echinococcus polymorphus*) contient une leucomaïne toxique. Quelques années plus tard, en 1886, R. Blanchard a pu ainsi expliquer les accidents consécutifs à la rupture, traumatique ou chirurgicale, des kystes hydatiques ; on sait que, parmi ces accidents, l'urticaire est peut-être le plus fréquent (2).

L'opinion du professeur Blanchard a été, en tous points, confirmée par les recherches ultérieures du Professeur Debove (3). Ce savant a reproduit les phénomènes toxiques par l'injection sous-cutanée de liquide hydatique filtré. Achard et Roy ont fait une bonne étude de cette intoxication hydatique, et Viron a retiré du liquide une toxalbumine.

Mourson et Schlagdenhauffen, en 1882, ont également rencontré chez le *Cysticercus tenuicollis*, larve du *Tænia marginata*, une substance toxique pour l'organisme du Lapin. D'après Leuckart, le liquide de la vésicule du *Cœnurus cerebralis* ingéré par la voie stomacale, chez le Chien, produit une très grave irritation du tube digestif ; l'animal ne tarde pas à succomber. O. Von Linstow

(1) Substances toxiques produites par les Parasites animaux. *Archives de Parasitologie*, X, p. 93, 1905.

(2) R. Blanchard. *Traité de Zoologie médicale*. Paris, 1885-1888.

(3) Debove : Pathologie de l'urticaire hydatique. *C. R. Acad. Sciences*, C V p. 1285, 1887. — De l'intoxication hydatique. *Bull. et Mém. de la Soc. Méd. des Hôp. de Paris* (3), v. p. 113-118, 1888.

rapporte que les Kirghises empoisonnent les Loups avec le liquide de la vésicule du *Cœnurus serialis*. Depuis 1886, les médecins russes et finlandais ont décrit avec beaucoup de soin l'anémie pernicieuse chez les porteurs du *Dibothriocephalus latus*. Il faut signaler ici les observations de Schauman à la Clinique médicale d'Helsingfors. Shapiro admet que, dans certaines conditions, le Bothriocéphale élabore un poison hémolytique. Cette opinion a été confirmée par les expériences de Schauman et Tallqvist : ces deux savants ont provoqué une anémie grave chez le Chien, mais non chez le Lapin, en pratiquant des injections sous-cutanées de divers extraits de Bothriocéphale.

Tous ces extraits renferment des hémolysines très actives (1). Dans ces dernières années, Bard a observé deux cas d'anémie bothriocéphalique, à Genève (2) ; les Drs Courmont et André ont publié, en 1903, une observation fort intéressante, recueillie à Lyon (3). Pour de plus amples renseignements, nous renvoyons le lecteur à l'excellent mémoire de Mlle N. Fédorov (4).

Il paraît bien établi aujourd'hui que la surface du corps des Teniadés : *Dipylidium caninum*, *Tænia cœnurus*, *T. solium*, *T. saginata*, *Moniezia expanza* excrète des substances actives, productrices d'accidents marqués chez un certain nombre d'animaux (Recherches de Mingazzini, Calamida, Messineo). Il est important de rapporter ici l'action nocive de l extrait de *Tænia cœnurus*.

« L'extrait de *Tænia cœnurus* provoque une intoxication aiguë, qui amène rapidement la mort. Injecté à faible dose sous la peau ou dans le péritoine du Chien, du Lapin ou du Cobaye, il amène une chute brusque de la température, puis de la parésie du train postérieur, des convulsions toniques et de la contracture. En moins de huit heures se manifeste une leucocytose intense avec abondance d'éosinophiles ; en même temps, les globules rouges commencent à se dissoudre. En moins de deux

(1) Tallqvist, Die Pathog. d. pernic, Anaemie mit, etc. *Zeitschr. f. Klin. Medizin*, LXI, 1907.

(2) Bard, L'anémie bothriocéphalique, *Semaine Médicale*, p. 241, 1902.

(3) J. Courmont et André, Sur un cas d'anémie pernicieuse à Bothriocéphale, *Journ. de Physiol. et de Pathol. générales*, V, p. 353, 1903.

(4) N. Fédorov, L'anémie bothriocéphalique, *Archives de Parasitologie*, VI, p. 207-244, 1902.

jours, les cellules hépatiques ont subi presque entièrement la dégénérescence graisseuse » (1).

Les expériences de Vaullegeard sur les extraits du *Bothriocephalus punctatus*, parasite du Turbot, et que nous avons retrouvé en abondance dans l'intestin du *Cottus budalis* (2), démontrent l'existence, dans ces extraits aqueux, de deux substances fort actives sur l'organisme de la Grenouille. L'alcool concentré précipite de l'extrait aqueux, une sorte d'enzyme, très toxique. Cette toxine agit spécialement sur les centres nerveux ; elle détermine d'abord des phénomènes d'excitation intense, puis la paralysie et l'arrêt de la respiration. Il reste en solution dans l'extrait aqueux traité par l'alcool fort une substance alcaloïdique qui présente une action curarisante. Si la Grenouille est très sensible à l'action de cet alcaloïde, par contre le Rat est très résistant.

En ce qui concerne les Acantocéphales, il faut signaler les recherches de Mingazzini. La pulpe du *Gigantorhynchus gigas*, en injection sous-cutanée, tue le Lapin et le Cobaye. Les désordres provoqués sont analogues à ceux produits par les extraits de Tænia. Nous avons confirmé les expériences de Mingazzini : le suc frais de l'Echinorhynque du Porc est très toxique pour le Lapin et renferme une substance hémolysante très active vis-à-vis le sang de Porc.

La toxicité de la Sarcosporidie de l'œsophage du Mouton : la *Balbiania gigantea* a été très étudiée. Pfeiffer a employé les extraits glycérinés et aqueux (3). Chez le Lapin, en injections hypodermiques, on observe à faible dose des accidents fébriles et à dose plus forte le collapsus et la mort. Les faits avancés par Pfeiffer ont été contrôlés par Laveran et Mesnil, qui ont désigné sous le nom de *Sarcocystine* la toxine non encore isolée de Pfeiffer (4). De même que pour le *Gigantorhynchius gigas*, nous avons recherché le pouvoir toxique de la *Balbiania gigantea*. Nous pouvons dire de suite que

(1) R. Blanchard, Substances toxiques produites par les parasites animaux. *Archives de Parasitologie*, X, p. 93, 1905.

(2) Th. Bondouy, *Du rôle des Tubes pyloriques dans la digestion chez les Téleostéens*. Thèse pour le Diplôme de Pharmacien supérieur, p. 33.

(3) G. Pfeiffer, *Die Protozoen als Krankheitserreger*, Jena, G. Fischer, 1891.

(4) A. Laveran et F. Mesnil, De la Sarcocystine, toxine des Sarcosporidées. *C. R. Soc. Biologie*, p. 311, 1899.

l'extrait aqueux de ce parasite (1 cc) a tué un Lapin de poids moyen au bout de 12 heures.

D'autre part, nous avons contrôlé le pouvoir hémolytique de l'extrait aqueux, suivant le désir formulé par le Professeur R. Blanchard (1) : l'extrait aqueux renferme une substance douée d'un fort pouvoir hémolytique vis-à-vis les globles rouges du Lapin.

Au sujet du paludisme, plusieurs théories ont été émises pour expliquer la genèse des accès fébriles ; or, la seule qui paraît la plus rationnelle est celle du Professeur Blanchard (2) ; les *Plasmodium vivax* (fièvre tierce), *Pl. malariae* (fièvre quarte), *Pl. falciparum* (fièvre pernicieuse), produisent des toxines :

« La fièvre, dit le Professeur R. Blanchard, est le résultat d'une intoxication et non d'une réaction spontanée de l'organisme.... Tant que les schizontes sont confinés dans les hématies, les toxines s'accumulent à l'intérieur de cette dernière ; donc, aucune répercussion possible sur l'organisme. Mais voici les mérozoïtes en liberté ; les toxines sont alors déversées dans le sang et les phénomènes d'intoxication s'ensuivent. L'accès fébrile prend donc naissance : il est d'autant plus violent que les toxines sont déversées dans le plasma en plus grande abondance, autrement dit que les hématies parasitées sont elles-mêmes en plus grand nombre ; il dure tant que les substances toxiques n'ont pas été éliminées par la sueur et l'urine. La toxicité urinaire augmente, en effet, à la suite des accès de fièvre, ainsi que Brousse, puis Roque et Lemoine l'ont reconnu dès 1890. »

Cette théorie de l'accès fébrile, du professeur R. Blanchard, a été reprise, en 1903, par J. Regnault. Cet auteur admet l'existence de deux toxines : une toxine pyrétogène et une toxine hémolytique (3).

Les recherches sur la toxicité des Nématodes ont été fort nombreuses et ont donné lieu à beaucoup de controverses. Passons d'abord en revue ce qui a été publié sur les *Ascaris*. Miram, Cobbold, Bastian, Huber, Von Linstow ont étudié l'Ascaride du Cheval ;

(1) R. Blanchard, Substances toxiques produites par les parasites animaux. *Archives de Parasitologie*, X, p. 87, 1905.

(2) R. Blanchard, *Climat, hygiène et maladies*, Madagascar au début du XX[e] siècle, p. 397-452, 1902.

(3) J. Regnault, Toxines pyrétogènes dans le paludisme. *Revue de Médecine*, XXIII, p. 728, septembre 1903.

Ascaris megalocephala. D'après ces divers auteurs, le contact de ce Nématode produit une irritation de la peau et des muqueuses. R. Blanchard rapporte le fait suivant : « Une étudiante en médecine, en disséquant des Ascarides du Cheval, conservés dans l'alcool depuis quelques jours, eut le front couvert de vésicules séreuses qu'on eût prises pour des bulles d'urticaire et, le lendemain, il n'y en avait plus trace. »

Mingazzini et Vaullegeard étudient les extraits d'Ascaride du Porc. Ces extraits sont toxiques pour le Cobaye et amènent de graves désordres chez le Chien. Vaullegeard, à l'aide de l'alcool, en a retiré deux toxines. De notre côté, nous avons recherché le pouvoir toxique de l'extrait aqueux de l'*Ascaris megalocephala* sur le Cobaye; nous avons constaté, comme nous le relaterons dans un autre Mémoire, un amaigrissement rapide et la mort de l'animal. Les résultats précédents ont été battus en brèche par divers expérimentateurs, notamment par L. Jammes (1) et H. Mandoul. De très nombreuses observations faites au Dispensaire de Toulouse, sur des enfants, et de multiples expériences entreprises avec les sucs de *Tænia inermis*, *T. expansa*, *T. serrata*, *Ascaris vituli* et *A. megalocephala* injectés au Chien, au Cobaye, au Lapin, au Pigeon, ces deux auteurs tirent les conclusions suivantes :

1° La production exceptionnelle de troubles chez les hôtes de vers intestinaux vulgaires et l'innocuité des liquides extraits du corps de ces parasites tendent à démontrer que les manifestations morbides observées sur les hôtes ne peuvent être rapportées à des propriétés toxiques, habituelles, des vers qu'ils hébergent ;

2° Il semble plus rationnel de rattacher les troubles à des réactions d'ordre essentiellement mécanique ; les irritations causées par les Vers sur la muqueuse intestinale peuvent être, en effet, le point de départ de désordres nerveux.

Les résultats de Jammes et Mandoul ont été contestés par Isaac et von den Velden.

Plusieurs auteurs : Becker, Morsasca, Burcharot, Moosbrugger, Sandler, Letulle et Lemierre ont publié des cas d'anémie très grave chez des malades porteurs d'un nombre plus ou moins considérable de Trichocéphales. N'ayant pas trouvé de lésions au

(1) G. Jammes et Mandoul, Sur l'action toxique des Vers intestinaux. *C. R. Acad. Sciences*. CXXXVIII, p. 1734, 1904.

point de fixation de ces Nématodes sur la muqueuse intestinale et s'appuyant parfois sur l'absence de microbes dans le sang du malade, ils ont conclu que l'anémie en question était due à une toxine sécrétée par le Trichocéphale.

Calmette et Breton ont pu, dans une expérience faite à l'Institut Pasteur de Lille, voir que les extraits d'Ankylostome dissolvent les hématies de l'Homme. Preti a signalé, chez ce parasite, l'existence d'une substance qui devient hémolytique une fois combinée avec la lécithine (1).

L'éosinophilie, phénomène très fréquent dans l'*helminthiase*, peut être attribuée, dans la plupart des cas, à l'action de substances toxiques élaborées par les parasites. Pröscher injecte dans le péritoine du cobaye une émulsion de *tæniotoxine* (substance extraite du *Tænia solium*) et remarque au bout de peu de temps l'apparition de leucocytes oxyphiles dans le liquide exsudé (2). Cette éosinophilie peut atteindre jusqu'à 72 p. 100 avec l'*Uncinaria duodenalis*, 34 p. 100 avec le *Tænia saginata*, 13,5 p. 100 avec le *Strongyloïdes intestinalis*, 8,5 p. 100 avec l'*Ascaris lumbricoïdes*, 16 p. 100 avec l'*oxyurus vermicularis* (3). Il résulte des recherches de Bruno, Liefmann et Mäckel sur l'*Uncinaria duodenalis* ou *Ankylostome* que la constance de l'éosinophilie constitue un des signes les plus manifestes de l'infection parasitaire ; or, il est admis aujourd'hui par tous les parasitologues que le Ver, producteur de la *Chlorose d'Egypte* ou *anémie des mineurs*, sécrète des substances toxiques. D'après O. Liermberger, le nombre de leucocytes éosinophiles augmente considérablement lorsque le malade est en voie de guérison. Levaditi en conclut : « Etant donné que, dans la conception d'Erlich, les éléments éosinophiles sont fabriqués par le tissu myéloïde, le fait constaté par Liermberger indiquerait que ce tissu, au fur et à mesure que l'infection s'atténue, récupère de nouvelles forces génératrices, qu'il manifeste en livrant au torrent circulatoire un plus grand nombre de ces éléments oxyphiles (4). »

(1) Preti, *Bulletin de la Société médico-chirurgicale de Pavie*, janvier 1908.

(2) Pröscher, Ueber experimentelle Erzengung von eosinophilen Exsudaten (Ein Beitrag zur lokalen Entstehung eosinophilen zellen). *Folia haematologica*, II, p. 543, 1905.

(3) Guiart et Grimbert. *Diagnostic chimique, microscopique et parasitologique*, 2e édition, p. 166.

(4) Levaditi, Les nouvelles recherches hématologiques sur le globule blanc. *Bulletin de l'Institut Pasteur*, 15 nov. 1905.

Balfour, Kantiky Bey, du Caire, ont constaté l'éosinophilie chez les individus porteurs de *Bilharzia hæmatobia* (1) ; Wurtz et Clerc ont observé le taux de 53 p. 100 dans un cas de *Filaria loa*.

L'éosinophilie de la trichinose a été soigneusement étudiée par Brown (1898) et par Schleip (1902).

Ce dernier savant a acquis la conviction, pendant une grave épidémie de trichinose survenue dans les environs de Cassel, que l'éosinophilie a une grande valeur diagnostique.

L'éosinophilie sanguine est bien connue dans les cas de kystes hydatiques. Les cas publiés sont fort nombreux. Memmi, sur un ensemble de 12 cas, donne un pourcentage de 7 à 20 p. 100 (2) ; Tuffier et Milian rapportent les chiffres de 4 p. 100 dans un kyste non suppuré du poumon, 2 p. 100 dans un kyste suppuré du foie (3). Les chiffres de 12 p. 100 sont donnés par Darguein et Tribondeau (4), de 4 p. 100 par Achard et Clerc (5), de 57 p. 100 par Seligman et Dudgeon (6), de 4 p. 100 par M. Labbé (7), de 13 p. 100 par Badelli (8), de 6,25 p. 100 par Chauffard (9), de 20 p. 100 par Sabrazès (*C. R. Soc. biol., Réunion biologique de Bordeaux*, 9 avril 1907).

En injectant du liquide hydatique dans la cavité péritonéale de divers animaux, Achard, Memmi, Darguein et Tribondeau ont provoqué une éosinophilie. Dans ces dernières années, H. Rossello a repris cette question de l'éosinophilie dans les cas de kystes hydatiques (10). Voici le résumé de ces observations :

1° Kystes de différents organes *non suppurés* : l'éosinophilie oscille entre 8,5 et 5 p. 100 dans les cas les plus riches et 1,5 à 2 p. 100 dans les cas les plus pauvres. La grande majorité est entre 3,5 et 4,5 p. 100. Les chiffres de Rossello n'ont jamais dépassé 8,5 p. 100 ;

(1) Balfour, Eosinophilia in Bilharzia disease and dracontiasis. *Lancet*, n° 4189, 1904.

(2) Memmi, *Congrès de Pise*, oct. 1901.

(3) Tuffier et Milian, *Société Anatomique de Paris*, 4 oct. 1901.

(4) Darguein et Tribondeau, *C. R. Soc. Biologie*, 16 nov. 1901.

(5) Achard et Clerc, *Société Médicale des Hôpitaux*, 13 juillet 1900.

(6) Seligman et Dudgeon, *The Lancet*, 21 juin 1902.

(7) M. Labbé, *Traité d'Hématologie*, p. 624.

(8) Badelli, *Annali d'ottalmologia*, Pavia, 1905.

(9) Chauffard, *Journal des Praticiens*, 10 mars 1906.

(10) H. Rossello, Sur l'éosinophilie hydatique. *C. R. Soc. Biologie*, 9 nov. 1907.

2° Kystes *suppurés* ou *dégénérés* : ici, l'éosinophilie manque en général.

De l'ensemble de ces observations, Rossello tire les conclusions suivantes :

1° Dans le cas où le parasite est *vivant*, l'éosinophilie est constante ;

2° L'éosinophilie est, en général, *médiocre* (moyenne de 4 p. 100) ;

3° Quand le parasite *meurt* (soit par suppuration, soit par dégénérescence, soit par l'invasion du kyste par des liquides étrangers tels que la bile), l'éosinophilie *cesse* ;

4° De même, quand le kyste est enlevé chirurgicalement, l'éosinophilie cesse rapidement (d'après Chauffard, la ponction produit le même résultat) ;

5° La localisation du kyste dans les différents organes n'a aucune influence apparente.

Rossello déduit des faits précédents que l'éosinophilie hydatique a :

1° Une valeur diagnostique dans certains cas douteux ;

2° Une véritable valeur pronostique. En effet, si le chirurgien a enlevé un kyste, la réaction sanguine doit disparaître ; si elle persiste, c'est qu'il existe probablement un autre kyste (s'il n'y a pas une autre cause d'éosinophilie), et alors se pose la question d'une nouvelle opération. C'est pour cette raison que l'on doit examiner le sang de tous les malades atteints de kystes hydatiques après l'opération. Enfin, dans certains cas, cette recherche pourra donner des renseignements sur l'évolution d'un kyste inopérable au point de vue de la vitalité du parasite.

Il s'agit maintenant d'expliquer le mécanisme de cette éosinophilie dans les helminthiases.

Ehrlich soutient avec l'autorité qui s'attache à son nom la *nature chimiotaxique* de l'éosinophilie. Cette opinion est partagée par Levaditi (1). « Les globules blancs oxyphiles, doués de mouvements propres, sont sensibles à l'excitation de certains agents chimiotaxiques spécifiques et réagissent vis-à-vis de

(1) Levaditi, Les nouvelles recherches hématologiques sur le globule blanc, *Bulletin de l'Institut Pasteur*, 15 nov. 1905.

cette excitation en abandonnant en masse leur lieu de formation: la moelle osseuse, pour envahir le torrent circulatoire et les tissus ». Mais la question intéressante est de savoir si ces substances, qui exercent un chimiotaxisme positif vis-à-vis des éosinophiles, sont élaborées par les parasites et déversées dans le sang, ou bien si la présence seule des Vers dans le sang suffit à attirer ces leucocytes? Dans le cas de parasites fixés, implantés dans une muqueuse, il n'est guère possible de ne pas admettre l'action de substances fabriquées par le parasite dans la production de l'éosinophilie. Nous citerons l'exemple du *Sclerostomum equinum*, parasite de l'intestin du Cheval, dont nous étudierons plus loin la composition chimique. Ce Ver, fixé dans la muqueuse du cœcum, élabore des hémolysines, produit chez le Cheval, lorsqu'il y est très abondant, une cachexie marquée et amène chez son hôte une éosinophilie. Weinberg donne le chiffre de 19,8 p. 100 (1). D'ailleurs, l'éosinophilie est bien sous la dépendance de l'activité cellulaire du parasite (Rossello a constaté qu'elle cesse *dès* que le parasite meurt).

D'après ce qui précède, nous admettons que l'éosinophilie est une réaction de défense spéciale, provoquée par certaines substances toxiques élaborées par le parasite, substances qui exercent un chimiotaxisme positif vis-à-vis des Oxyphiles.

Les dernières recherches de Weinberg ont démontré nettement l'action toxique des parasites intestinaux (2). Les substances toxiques du *Sclerostomum equinum* et de l'*Ankylostome* passent dans l'organisme. A l'autopsie, Weinberg a constaté un dépôt abondant de pigment ferrugineux dans la rate, le foie, le rein (au niveau des glomérules de Malpighi, des tubes contournés de Ferrein, des tubes de Bellini). Ce pigment est également fixé sur un grand nombre de mononucléaires, dans le sang. Nous avons eu nous-même l'occasion d'observer, aux Abattoirs de Vaugirard, chez un Cheval très cachectisé et dont le cœcum était bourré de sclérostomes, la grande diffusion de ce pigment ferrugineux sur tous les

(1) Weinberg, Action de l'extrait de Sclérostomes sur le sang de Cheval. *Annales de l'Institut Pasteur*, p. 798, 1907.

(2) Weinberg, Passage dans l'organisme des substances toxiques sécrétées par les Helminthes : Sclérostome, Oésophagostome, Ankylostome. *C. R. Soc. Biologie*, 11 janvier 1908.

muscles. La plupart des tissus et muscles avaient une teinte ocreuse.

Railliet et Nocard ont observé sur les Chevaux de la Marne une anémie pouvant amener la mort et provoquée par le *Sclerostomum tetracanthum* (1). De même, le *Sclerostomum robustum*, qui vit dans le cœcum du Mulet produit une cachexie grave chez cet animal (2).

La *Sclerostomum hypostomum*, qui habite le gros intestin de la Chèvre, du Mouton et de divers Ruminants sauvages : Cerf, Chevreuil, Daim, Argali, Antilopes, peut amener chez ces Animaux une anémie mortelle.

L'imprégnation de l'organisme par les substances toxiques élaborées par les Parasites a encore reçu un appui sérieux, dans ces dernières années, grâce à l'application de la réaction de Bordet-Gengou. Guedini, en 1907, a trouvé des anticorps spécifiques dans le sérum d'animaux porteurs de *Kyste hydatique*, d'*Ascarides* et de *Ténia armé* (3). En 1908, Weinberg et Parvu ont également constaté, dans un certain nombre de cas, la présence d'anticorps spécifiques dans le sérum de Chevaux parasités par les *Sclérostomes*, les *Ténias*, les *Oestres* et les *Ascarides* (4).

(1) Railliet, *Traité de Zoologie médicale et agricole*, p. 459.

(2) J. M. Giles, On a new Sclerostome from the large intestine of Mules. *Scientific Mémoirs by médical officers of the army of India*, VII, Calcutta, 1892.

(3) Guedini, Richerche sul siero di sangue, etc. *Gazetta degli ospedali e delle cliniche*, n° 153, 1906.

(4) Weinberg et Parvu, Réaction de Bordet-Gengou dans les helminthiases. *C. R. Soc. Biologie*, 17 octobre 1908.

Action du Suc de Sclérostomes sur le Sang du Cheval

Recherches de Weinberg

Nous avons dit plus haut que le point de départ de nos recherches chimiques sur le *Sclerostomum equinum* avait été les publications de Weinberg (1). Nous résumons ainsi les conclusions du Dr Weinberg :

1° L'extrait aqueux de *Sclerostomum equinum* hémolyse les globules rouges du sang de Cheval ;

2° L'extrait éthéré est également actif ;

3° L'extrait alcoolique s'est montré sans action sur les hématies ;

4° C'est surtout la partie céphalique du Ver qui renferme la substance toxique ;

5° L'hématoxine n est pas spécifique : elle dissout les hématites du Lapin, du Cobaye, du Bœuf et du Mouton. Elle détruit à peine les globules rouges de l'Homme ;

6° L'extrait aqueux empêche la coagulation du sang de Cheval ;

7° Le sérum de Cheval n'empêche pas l'hémolyse des globules rouges par l'extrait simple ni par l'extrait chauffé à 56°. Par contre, il a une action très nette sur l'extrait bouilli ou stérilisé à 115° C. (le sérum chauffé à 56° a une action empêchante un peu plus prononcée).

Expériences sur divers extraits de « Sclerostomum equinum ».

A. *Extraits aqueux.* — Nous préparons un extrait aqueux de *Sclerostomum equinum* de la façon suivante :

Dès la rentrée du laboratoire, les parasites encore vivants, recueillis aux Abattoirs de Vaugirard, sont lavés plusieurs fois

(1) Weinberg, *Action de l'extrait de Sclérostomes sur le sang de Cheval et sur une hématoxine d'origine vermineuse. Annales de l'Institut Pasteur*, p. 798, 1907. *C. R. de la Société de Biologie*, 6 juillet 1907.

à l'eau physiologique, puis rapidement séchés entre des doubles de papier-filtre. Neuf grammes de Vers sont triturés soigneusement au mortier avec du sable fin lavé et autoclavé, de façon à obtenir une pulpe épaisse et homogène. Après une macération d'une heure, la masse est centrifugée et l'extrait aqueux surnageant est décanté. Nous avons renoncé à la filtration, car cette opération est *fort longue* et l'extrait, riche en albumines, peut ainsi subir un commencement d'altération.

L'extrait aqueux obtenu est rouge-brun, d'odeur forte, de réaction légèrement acide au tournesol.

D'autre part, le sang de Cheval défibriné est lavé trois fois de suite avec de l'eau physiologique et la dernière purée globulaire est diluée dans de l'eau salée dans le rapport de 1 pour 20. Après chaque lavage, les globules sont séparés par une centrifugation.

Dans un tube n° 1 : temoin, on a placé :

XIII gouttes de sang de Cheval dilué à 1 p. 20 + V gouttes d'eau physiologique.

Dans un tube n° 2 :

XIII gouttes de sang dilué + V gouttes d extrait aqueux.

Les deux tubes sont portés à l'étuve, à 37° C.

On pratique, au bout *d'une heure*, la numération des globules rouges au compte-globules de Malassez.

Résultat : Tube témoin n° 1 : nombre de globules = 91

Tube n° 2 nombre de globules = 12

Il y a donc eu hémolyse notable.

Autres expériences : La pulpe de 15 grammes de Vers est reprise par 15 cc d'eau physiologique et centrifugée ; 1 cc de sang frais de Cheval (lavé 3 fois) est dilué dans 20 cc d'eau physiologique.

On pratique deux expériences parallèles :

1re *Expérience :* Tube n° 1 : *témoin :* XX gouttes de sang dilué + III gouttes d'eau physiologique.

Tube n° 2 : XX gouttes de sang dilué + III gouttes d'extrait aqueux.

2e *Expérience :* Tube n° 3 : *témoin :* XX gouttes de sang dilué + V gouttes d'eau physiologique.

Tube n° 4 : XX gouttes de sang dilué + V gouttes d'extrait aqueux.

Les 4 tubes sont portés, à l'étuve, à 37° C.

Résultats au bout d'une heure (numération toujours faite au compte-globules de Malassez) :

1re expérience	Tube N° 1 : *témoin :*	253 globules.
	Tube N° 2 :	60 globules.
2e expérience	Tube N° 3 : *témoin :*	267 globules.
	Tube N° 4 :	17 globules.

Une nouvelle recherche effectuée avec V gouttes d'extrait aqueux sur XX gouttes de sang dilué a donné, au bout d'une heure d'étuve, à 37° C : 12 globules.

Il résulte très nettement des essais précédents que l'extrait aqueux de sclérostomes possède un pouvoir hémolytique manifeste, et que *ce pouvoir est proportionnel à la quantité d'extrait aqueux.*

B. — *Extrait alcoolique*, obtenu avec de l'alcool à 95°.

Cet extrait hémolyse complètement les globules de Cheval lavés en une heure et les globules de Lapin au bout de six heures.

Nous avons remarqué que l'alcool *chaud* (à 40° C) donnait un rendement supérieur en extrait actif.

C. — *L'extrait éthéré* s'est montré actif ; mais son action est moins énergique que celle de l'extrait alcoolique.

D. — *L'extrait obtenu avec le toluène* hémolyse les globules de Cheval.

E. — *L'extrait acétonique* n'a aucun pouvoir hémolytique.

Après avoir ainsi constaté l'action de ces divers extraits, nous nous sommes demandé quelles étaient les espèces chimiques du Ver actives au point de vue hémolytique. Pour cela, il était indispensable d'entreprendre la chimie biologique du parasite.

Après bien des essais successifs, nous avons définitivement adopté la méthode suivante :

I. — RECHERCHE DES GRAISSES, LÉCITHINES, ACIDES GRAS ET SAVONS

Les Sclérostomes sont, dès leur arrivée du laboratoire, lavés plusieurs fois à l'eau physiologique, puis desséchés entre des doubles de papier à filtrer blanc. On les triture longuement avec

du sable fin purifié et stérilisé à l'autoclave, à 120° C. La pulpe obtenue est imprégnée d'une petite quantité d'éther tout récemment redistillé, répartie sur des assiettes que l'on dispose sous des cloches à vide sulfurique.

Au bout de 24 heures, la dessiccation est complète ; la pulpe se pulvérise facilement au mortier. Seules, les cuticules résistent à l'action du pilon et restent intactes. La poudre *bien sèche* est placée dans un flacon bouché à l'émeri, avec 4 fois son poids d'éther humide ; on agite fréquemment.

Il est nécessaire d'employer un assez grand volume d'éther, de façon à entraîner les lécithines peu solubles dans ce véhicule.

Après un contact de 24 heures, l'éther est décanté, puis remplacé par de nouvel éther (2 fois plus d'éther que de substance, en poids). On pratique une nouvelle macération de 24 heures. Nous avons remarqué qu'il faut 5 macérations successives de 24 heures chacune pour obtenir l'épuisement complet de la pulpe : la liqueur évaporée sur un verre de montre ne laisse plus de résidu. Les liqueurs éthérées sont réunies, et la pulpe ainsi épuisée est desséchée dans le vide sulfurique. *Elle sera reprise plus tard pour préparer un extrait aqueux.*

La solution éthérée, très légèrement colorée en jaune, est brassée pendant une heure dans une grande ampoule à décantation, avec un volume égal *d'eau distillée*. Ce traitement a pour but de retirer de suite les *savons alcalins* qui possèdent, comme l'ont montré Iscovesco (1) et Noguchi (2), une action hémolytique marquée. On recueille séparément les deux couches *éthérée* et *aqueuse*.

Portion aqueuse.— Elle est évaporée, au bain-marie, à une douce chaleur. Une partie du résidu d'évaporation est dissoute dans un peu d'eau physiologique pour la recherche du pouvoir hémolytique; l'autre partie est dissoute dans de l'eau distillée pour y rechercher les *savons alcalins*.

Recherche des savons alcalins. — La solution aqueuse, qui mousse beaucoup par l'agitation, est chauffée, puis traitée par quelques gouttes d'acide sulfurique dilué de moitié. Par le refroidissement, il se forme une pellicule mince, surnageante, graisseuse, probable-

(1) Iscovesco, *C. R. Soc. Biologie*, LXIV, p. 675.
(2) Noguchi, *Biochemische Zeitschrift*, VI, p. 327.

ment constituée par des acides gras. La masse est reprise par de l'éther, dans une ampoule à décantation ; l'éther séparé est évaporé à l'air libre, le résidu est repris par une solution faible de carbonate sodique ; la solution est neutralisée par HCl, puis traitée par le chlorure de baryum ; il s'est formé un précipité blanc assez abondant.

Dans une autre série d'essais, la portion aqueuse provenant du traitement par l'eau de la solution extractive éthérée a été directement traitée par une solution de chlorure de baryum ; il s'est également formé un précipité blanc.

Enfin, dans de nouvelles expériences, cette portion aqueuse a été saturée, dans un grand vase de Bohême, par un grand excès de cristaux de chlorure de sodium. Par le repos, au bout de 48 heures, il s'est séparé à la surface du liquide un gâteau d'une substance ayant tous les caractères physiques des savons. Ce gâteau, recueilli et dissous dans l'eau, a donné un précipité blanc par le chlorure de baryum.

Tous ces caractères, joints au mode d'extraction, nous font affirmer *la présence des savons alcalins* dans la portion aqueuse.

Recherche du pouvoir hémolytique. — Il est positif, mais faible.

Portion éthérée.— Elle est évaporée à l'air libre, à la température du laboratoire. On obtient ainsi une substance légèrement colorée en jaune, d'aspect gras, d'odeur forte. Une petite quantité étalée sur une lamelle de verre et exposée aux vapeurs d'acide osmique noircit fortement et rapidement.

On a fait deux parts de cette substance :

Première part. Recherche des acides gras : on la dissout dans de l'éther nouvellement redistillé, et la solution est agitée dans une ampoule à décantation avec une solution aqueuse faible de carbonate de soude (5 p. 1000) ; s'il y a des acides gras, ceux-ci passeront à l'état de savons sodiques et se dissoudront dans l'eau. Il se forme au sein du mélange une sorte de gelée faible. On agite vigoureusement et fréquemment après addition d'eau distillée, afin de rendre plus nette la ligne de séparation entre les deux liqueurs aqueuse et éthérée.

La liqueur inférieure aqueuse est reçue dans un grand vase de Bohême, puis additionnée d'un grand excès de sel marin ; on

observe un précipité blanc, abondant, qui devient bientôt grumeleux. Par le repos, le lendemain, un gâteau de savon s'est rassemblé à la surface ; on chauffe au bain-marie, pour rendre le gâteau plus compact.

L'extrait éthéré renferme donc des *acides gras libres*. La solution éthérée restée dans l'ampoule à décantation est évaporée à l'air libre : on a un résidu du *graisses* débarrassées des *acides gras*.

Deuxième part. Recherche du phosphore : les lécithines, solubles dans l'éther et insolubles dans l'eau, sont donc restées, si elles existent ici, dans la portion éthérée.

La substance grasse est presque entièrement soluble dans l'acétone (les lécithines sont insolubles dans ce véhicule). On y recherche *le phosphore* de la façon suivante : on calcine, dans une capsule de porcelaine, une certaine quantité de graisse en présence de carbonate de soude et de nitrate de soude purs. Le résidu blanc est repris à chaud par une solution azotique de molybdate d'ammoniaque ; il ne s'est pas formé de *précipité jaune* de phosphomolybdate d'ammoniaque ; donc, pas de phosphore et, par suite, *pas de lécithines*.

L'absence de lécithines dans l'extrait éthéré de Sclérostomes est d une grande importance.

C'est ainsi que Ranson, Noguchi, Flexner et Noguchi (1) ont montré que le pouvoir hémolytique de certaines substances : *saponine*, *agaricine*, *solanine*, *tétanolysine*, était activé par la lécithine.

Le même fait s'observe pour le *venin des Serpents*.

Kyes a montré que l'activateur du venin de *Cobra* était la lécithine. En 1908, Preti a signalé dans *l'ankylostome* l existence d'une substance qui devient hémolytique une fois combinée avec la lécithine.

Recherche des pouvoirs hémolytiques

1° *L'extrait éthéré initial* a produit rapidement l'hémolyse d'une purée globulaire de sang de Cheval, lavée.

Cette hémolyse doit être attribuée aux savons alcalins et aux acides gras libres (les graisses neutres du Sclérostome n'ont pas de pouvoir hémolytique) ;

(1) Flexner et Noguchi, Snake Venom, *Journal of Exp. Méd.*, 1902.

2° Extrait éthéré débarrassé des savons alcalins :

Tube n° 1. — Témoin : XX gouttes de purée globulaire + V gouttes d'eau physiologique.

Tube n° 2. — XX gouttes de purée globulaire + V gouttes d'eau physiologique, tenant l'extrait en suspension.

Au bout d'une heure à l'étuve, à 37° C, l'hémolyse est complète dans le tube 2. Le tube témoin n'a pas varié ;

3° Extrait éthéré privé des savons et des acides gras libres : cet extrait neutre au tournesol n'a aucun pouvoir hémolysant. Il faut rappeler ici que l'extrait acétonique (surtout riche en graisses) est dépourvu de tout pouvoir hémolysant.

Recherche de la Cholestérine

Si cette substance existe chez le *Sclerostomum equinum*, nous devons la déceler dans *l'extrait éthéré de ce parasite* (la cholestérine, insoluble dans l'eau, est soluble dans l'éther).

L'extrait éthéré, desséché, composé de graisses, de savons et d'acides gras libres, est mis à bouillir au réfrigérant ascendant avec 125 cc d'alcool absolu et 3 pastilles de potasse caustique, pendant 3 heures. Puis, on sature complètement par $So^4 H^2$ dilué et on ajoute un léger excès de cet acide ; la liqueur se trouble (acides gras). On reprend par une solution aqueuse étendue de carbonate sodique pour dissoudre les acides gras à l'état de savons de soude.

La liqueur aqueuse, savonneuse, est épuisée à froid un grand nombre de fois par le chloroforme (la cholestérine est très soluble dans le chloroforme).

Pour rechercher la cholestérine dans la solution chloroformique, on a pratiqué les essais suivants :

1° Une partie de la solution a été doucement évaporée au bain-marie ; puis, les dernières portions ont été évaporées à l'air libre. A l'examen microscopique du résidu, pas de cristaux (les lamelles rhomboïdales de la cholestérine sont caractéristiques) ;

2° *Réaction de Schiff.* — Le résidu d'évaporation est chauffé, au bain-marie, au contact d'un peu d'acide azotique (dans ces conditions, la cholestérine donne une coloration jaune que l'ammoniaque fait virer au rouge-vif). *Négative* ;

3° *Réaction de Liebermann-Burchard.* — Le résidu d'évaporation est dissous dans un peu de chloroforme. A cette solution placée dans un tube à essai, on ajoute 2 à 3 gouttes d'anhydride acétique et goutte à goutte SO^4H^2 concentré (il se fait une coloration *rose*, puis *bleue*, qui passe ensuite au *vert-pré* en présence de cholestérine. La couleur verte apparaît de suite s'il y a très peu de cholestérine). *Négative*;

4° A la solution chloroformique, on ajoute un peu de SO^4H^2 pur. A la surface de séparation des deux liquides, il ne se développe pas la coloration rouge caractéristique. Donc, *pas de cholestérine*. Cette constatation est fort intéressante, car l'absence de cholestérine dans l'extrait éthéré explique l'activité hémolytique de cet extrait. En effet, H. Iscovesco et J. Foucaud ont montré que la cholestérine a un pouvoir antihémolytique considérable à l'égard des savons (1).

(1) H. Iscovesco et Foucaud, Le rôle antihémolytique de la cholestérine à l'égard des savons. *C. B. Soc. Biol.*, 11 avril 1908.

Action du Suc de « Sclerostomum equinum » sur les graisses du sérum de Cheval

1° *Préparation des graisses.* — Un litre de sérum recueilli aux Abattoirs de Vaugirard est concentré dans le vide, à une température de 30° c, jusqu'en consistance pâteuse. L'extrait mou ainsi obtenu est évaporé à siccité dans le vide sulfurique. Le résidu est détaché sous forme d'écailles brunes, qu'on réduit en poudre fine. Cette poudre est épuisée successivement dans une ampoule à décantation par l'éther rectifié (macération de 40 heures) ; par le sulfure de carbone (macération de 12 heures) et par l'éther de pétrole. Le mélange des dissolvants a été évaporé à l'air libre et le résidu blanc-jaunâtre, d'odeur de graisse, a été desséché dans le vide sulfurique ;

2° *Préparation de l'extrait de Sclérostomes.* — Cet extrait aqueux a été préparé aux Abattoirs de Vaugirard avec 50 grammes de parasites *virants*. Les Sclérostomes, aussitôt détachés de la muqueuse intestinale sont lavés plusieurs fois à l'eau physiologique tiède, puis triturés au mortier avec du sable purifié. La pulpe épaisse est traitée par une petite quantité d'eau distillée et quelques gouttes de toluène.

Après une macération de 3 heures, la masse épaisse est exprimée à travers un linge fin. Les enveloppes des Vers sont totalement privées de leur contenu. C'est cet extrait aqueux, rendu aseptique par l'addition de toluène, qui va nous servir dans nos expériences.

Les graisses que l'on vient d'obtenir sont triturées au mortier et dissoutes dans la plus petite quantité d'éther possible ; la solution éthérée est incorporée dans un certain volume d'eau distillée. Par agitations répétées, on obtient une émulsion de graisses homogène qui nous permettra de répartir uniformément les corps gras dans les flacons en expérience.

Expériences :

Flacon A renferme { 30 cc d'extrait aqueux + 30 cc d'eau distillée + 15 cc d'émulsion de graisses.

Flacon B renferme { 30 cc d'extrait aqueux *bouilli* + 30 cc d'eau distillée + 15 cc d'émulsion de graisses.

Flacon C renferme { 60 cc d'eau distillée + 15 cc d'émulsion de graisses.

Le liquide du flacon C est légèrement acide ; il faut un 1/2 cc de solution $\frac{N}{10}$ de soude pour saturer cette acidité (la phtaléine du phénol nous a servi de réactif indicateur).

Les 3 flacons sont portés à l'étuve, à 37° C, fréquemment agités et examinés au bout de 18 heures :

La coloration rose du liquide C n'a pas disparu ; les graisses ne se sont donc pas acidifiées pendant l'expérience, sous l'influence simultanée du temps et de la chaleur de l'étuve.

Après avoir ajouté deux gouttes de phtaléine du phénol dans les flacons A et B, on procède au dosage de l'acidité du milieu à l'aide d'une solution $\frac{N}{10}$ de soude. Pour amener le virage au rose persistant, il faut verser 5 cc 1 de solution alcaline dans le flacon B et 8 cc 7 dans le flacon A. L'acidité du liquide, dans le flacon A, s'est donc sensiblement accrue.

Dans deux autres expériences, nous avons également constaté une notable augmentation de l'acidité dans le flacon A.

Il faut donc admettre l'intervention, dans le flacon A, d'une lipase, détruite par l'ébullition dans le flacon B.

Le Sclerostomum equinum sécrète donc un ferment lipasique qui saponifie les graisses du sérum de Cheval.

Or, il est très intéressant de rapporter ici certains faits observés par Noguchi (1). Ce savant a remarqué que ni la lipase seule ni un corps gras (trioléine) ne peuvent hémolyser les globules rouges ; mais, si on ajoute à un mélange de globules et de lipase, soit de la trioléine, soit du beurre, on observe aussitôt une hémolyse. Le mélange, neutre au début, devient acide à mesure que l'action se prolonge.

(1) H. Noguchi, Über eine lipolytische Form der Hämolyse, Biochem. Zeitschrift, VI, 185-191, 1907.

Devant ces observations, nous admettons que la lipase sécrétée par le Sclérostome est intimement liée à l'action hémolytique de ce Ver.

II. — PRÉPARATION D'UN EXTRAIT AQUEUX ET RECHERCHES SUR CET EXTRAIT

La pulpe de Vers ayant subi l'action dissolvante de l'éther est évaporée sur des assiettes ; la dessiccation est rapide. Cette pulpe est ensuite traitée, à plusieurs reprises, par de l'eau distillée, à 50° C. Chaque traitement par l'eau chaude est suivi d'une macération de 12 heures. On épuise par l'eau jusqu'à ce que ce dissolvant soit à peine coloré. Le sable mélangé à la pulpe se dépose très facilement et les cuticules surnagent, en grande partie. Les liqueurs aqueuses, jaunes, sont réunies et passées à travers une toile, avec une légère expression. L'extrait est à nouveau filtré sur un tampon de coton hydrophile. Nous avons renoncé à la filtration à travers les filtres de papier ; l'opération est interminable et le liquide s'altère rapidement, surtout pendant les chaleurs de l'été. De même, pour la même raison, il faut avoir soin de ne pas prolonger trop longtemps la durée des macérations.

Le filtrat limpide, de couleur brun foncé, est évaporé dans le vide à une température maxima de 50° C. On obtient ainsi un résidu brun, d'odeur forte, assez abondant. Le rendement est de 4 gr. 70 pour 100 grammes de pulpe de Vers.

La concentration dans le vide est une opération assez longue ; aussi faut-il avoir soin de s'entourer de toutes les précautions pour empêcher un commencement d'altération de la liqueur extractive. A cet effet, le flacon contenant l'extrait aqueux à évaporer est disposé dans un récipient rempli d'eau froide ou de glace (pendant l'été) ; de plus, nous versons à la surface de cet extrait une légère couche d'éther. Il est toujours bon de disposer entre la source de chaleur et le liquide extractif un écran protecteur. Un thermomètre placé dans le bain-marie renfermant le ballon où se concentre l'extrait doit être soigneusement surveillé. Au bout de quelque temps, en réglant l'arrivée du gaz, on arrive assez facilement à obtenir une température constante.

Recherches des albumines dans l'extrait aqueux. — Une très petite

quantité de l'extrait que nous venons de préparer est dissoute dans de l'eau distillée. La solution filtrée et limpide a été soumise aux essais suivants :

Réactions de coloration	Réaction du biuret : positive.
	Réaction de Millon : positive
	Réaction xanthoprotéique : positive
	Réaction d'Adamkiewicz : positive.
Réactions de précipitation	Alcool à 95° : léger précipité blanc.
	Acide azotique, à froid : anneau blanc, de formation rapide.
	Acide picrique : abondant précipité.
	Réactif de Tanret : abondant précipité.
	Chaleur à 100° + acide acétique : précipité.
	Ferrocyanure de potassium en solution acétique : précipité très abondant.

L'extrait aqueux renferme donc des *albumines*.

Pouvoir hémolytique de l'extrait aqueux

Tube N° 1 : témoin : XX gouttes de sang de Cheval lavé et dilué + V gouttes d'eau physiologique.

Tube N° 2 : XX gouttes de sang de Cheval lavé et dilué + V gouttes de la solution d'extrait aqueux dans l'eau physiologique.

Examen au bout d'une heure d'étuve, à 37° C : *l'hémolyse est complète.*

III. — TRAITEMENT DE L'EXTRAIT AQUEUX PAR L'ALCOOL CONCENTRÉ ET CHAUD

L'extrait aqueux précédent est traité par de l'alcool à 95°, porté à 40° C à quatre reprises différentes. (Des essais préalables nous ont donné un rendement en extrait bien supérieur par l'emploi de l'alcool chaud.) On pratique :

Une première macération de 30 heures, puis 3 macérations successives de 6 heures chacune. De cette façon, la durée totale de contact avec l'alcool concentré ne dépasse pas 48 heures. (Un contact trop prolongé pourrait insolubiliser cer-

taines albuminoïdes.) Il faut avoir soin de brasser très souvent la masse afin d'augmenter le pouvoir dissolvant de l'alcool. Le liquide du dernier macéré est incolore et ne laisse plus de résidu par évaporation sur un verre de montre.

Les quatre liqueurs alcooliques sont réunies et seront, plus tard, distillées dans le vide. L'alcool à 95°, à la température de 40°, enlève ainsi environ 18 p. 100 de l'extrait aqueux.

L'extrait aqueux restant, privé des substances solubles dans l'alcool concentré, a été l'objet des essais suivants :

Recherches sur l'extrait aqueux non dissous par l'alcool concentré et chaud. — L'extrait est repris par de l'eau distillée froide : presque tout se dissout (le contact de l'alcool a insolubilisé une très faible portion d'extrait aqueux). On obtient un liquide brun-rouge, à réaction neutre, moussant par l'agitation. Ce liquide est filtré à travers un filtre blanc préalablement gonflé par des lavages à l'eau distillée.

A. — Sur une portion de ce filtrat très limpide, nous avons refait un certain nombre de réactions de coloration et de précipitation des substances albuminoïdes. Elles ont été toutes positives.

La liqueur a donné, *à froid*, des coagulums avec la solution picrique, le Réactif de Tanret, l'acide trichloroacétique. Mais ces trois précipités se dissolvent presque entièrement à *l'ébullition*, pour se reformer par *le refroidissement*, après filtration à chaud. C'est là un caractère spécial des *peptones* et des *albumoses*.

B. — *Recherche des nucléoprotéides et de la mucine.* — A l'autre portion de la liqueur, de beaucoup la plus considérable, nous ajoutons une petite quantité d'eau distillée *légèrement* acétique. Il se fait un précipité peu abondant, dû aux *nucléoprotéides* ou à la *mucine*. On continue de verser, peu à peu, avec beaucoup de précaution, de l'eau acétique, jusqu'au maximum de précipitation. On s'assure en opérant, à part, dans un tube à essai, que le précipité formé est insoluble dans un excès d'acide acétique. Au bout de 24 heures de repos à la glacière, la liqueur est filtrée à travers un tout petit filtre à analyses, sans plis. Le précipité du filtre est soigneusement lavé, à plusieurs reprises, avec de l'eau acétique, puis desséché dans le vide sulfurique, à l'aide de la trompe. Le précipité sec est partagé en deux parties, sensiblement égales.

Dans la première part, nous avons recherché le *Phosphore* de la façon suivante : la substance est calcinée dans un creuset de porcelaine avec un peu d'azotate et de carbonate de soude purs. Le résidu blanc est repris à froid par un peu d'eau acidulée par l'acide azotique ; on chauffe doucement et on ajoute quelques gouttes d'une solution de molybdate d'ammoniaque pur : il ne se produit pas de coloration jaune due au phosphomolybdate. Donc, pas de P ; par suite, *pas de nucléoprotéides*.

Dans la deuxième part, nous avons recherché la mucine : la substance est hydrolysée avec de l'acide chlorhydrique dilué. La liqueur réduit, après neutralisation par la soude, la solution de Fehling. Ce pouvoir réducteur, joint à l'insolubilité du précipité dans un excès d'acide acétique, nous fait admettre *l'existence d'une mucine* dans la liqueur (les mucines donnent beaucoup de sucre réducteur, jusqu'à 35 p. 100 de glucosamine).

Recherches des albumoses et des peptones. — La liqueur extractive précédente, débarrassée de la mucine, est additionnée dans un grand vase de Bohême d'un excès de cristaux de sulfate d'ammoniaque pur. On agite fréquemment. Au bout de 24 heures, il s'est formé du sein de la liqueur d'abondants flocons blancs qui se déposent lentement. On attend encore 24 heures pour bien permettre aux légers flocons de se rassembler. Le sulfate d'ammoniaque, à *saturation et en excès*, précipite toutes les albuminoïdes, *sauf les peptones* ; on filtre la liqueur et le précipité rassemblé sur le filtre est lavé, à plusieurs reprises, avec une solution saturée de sulfate d'ammoniaque. Le filtrat ne donne plus les réactions des albuminoïdes (ne coagule pas par la chaleur, ne précipite pas par l'acide azotique le tanin acétique).

Il ne donne plus les réactions *des peptones et des albumoses* constatés avant le traitement par le sulfate d'ammoniaque (précipités à froid par la solution picrique, le réactif de Tanret, l'acide trichloroacétique, solubles à chaud, se reformant par le refroidissement). Or, les peptones *seules* peuvent être restées en solution et se retrouver dans le filtrat ; donc, *pas de peptones*, et le précipité du filtre renferme des *albumoses* (Kühne a montré que les diverses albumoses sont précipitées par le sulfate d'ammoniaque).

Recherche du pouvoir hémolytique de l'extrait aqueux après l'épuisement par l'alcool :

Tube N° 1 : témoin : XX gouttes de sang de Cheval lavé et dilué : + V gouttes d'eau physiologique.

Tube N° 2 : XX gouttes de sang de Cheval lavé et dilué : + V gouttes d'extrait.

Pas d'hémolyse.

Conclusion. — L'alcool cencentré a donc enlevé à l'extrait aqueux *toutes les substances hémolysantes.*

Weinberg a montré que l'extrait aqueux a un pouvoir anticoagulant sur le sang de Cheval. Or, il est possible qu'ici, ce pouvoir appartienne en partie aux *albumoses* qui jouissent, comme l'on sait, d'un pouvoir anticoagulant.

IV. — RECHERCHES SUR L'EXTRAIT ALCOOLIQUE

Dans une première série d'essais, les quatre liqueurs alcooliques provenant de l'épuisement de l'extrait aqueux par l'alcool à 95°, chaud, ont été concentrées dans le vide, à une température maxima de 40° C. Cet extrait se présente sous la forme d'une pâte molle, jaune foncé, ayant l'aspect du cérumen et une odeur rappelant un peu celle de la dextrine. Il est assez soluble dans le toluène, insoluble dans l'acétone. Les solutions aqueuse et alcoolique précipitent abondamment par l'acétone, par le chlorure de platine. Ces propriétés physiques rapprochent cet extrait alcoolique de certains lipoïdes déjà décrits par nombre d'auteurs. Strecker (1) a montré que l'on pouvait précipiter les phosphatides ou lipoïdes de leurs solutions au moyen du chlorure de platine. Mais, d'après Erlandsen, Hoppe-Seyler, le chlorure de platine n'enlève de la solution que les 2/3 environ du lipoïde.

Recherche du pouvoir hémolytique. — L'hémolyse des globules de sang de Cheval est très rapide, complète au bout d'une demi-heure.

L'alcool a été employé par un certain nombre d'expérimentateurs pour l'extraction des lipoïdes hémolytiques. Korschun et Morgenroth (1) ont extrait, à l'aide de l'alcool, des lipoïdes hémolytiques

(1) Strecker, *Annalen der Chemie und Pharm.* CXLVIII, p. 117.

du pancréas, des glandes surrénales, de la rate et de l'intestin. Levaditi (2) à l'aide du même véhicule, a retiré une hémolysine du sérum sanguin.

Recherche des acides biliaires dans l'extrait alcoolique. — Nous avons mis à profit la *Réaction de Pettenkofer*. Une petite quantité d'extrait est délayée dans un verre de montre avec une goutte d'eau distillée jusqu'à émulsion complète. On ajoute un peu de poudre de sucre de canne, puis de l'acide sulfurique pur, goutte à goutte.

Nous n'avons pas obtenu la coloration rouge caractéristique due à l'action du furfurol sur l'acide cholalique, noyau commun des acides taurocholique et glycocholique.

L'essai a été renouvelé plusieurs fois, toujours négativement.

Donc, pas d'acides biliaires.

On sait que le glycocholate et le taurocholate de soude produisent l'hémolyse des globules rouges. Ces sels biliaires sont solubles dans l'eau et dans l'alcool, mais insolubles dans l'éther (Bile cristallisée de Plaitner). Dans la série des manipulations précédentes, les sels biliaires n'auraient pas été entraînés par l'éther, mais seraient passés successivement en solution aqueuse, puis en solution alcoolique.

Le pouvoir hémolytique de l'extrait alcoolique ne peut donc pas être attribué aux sels biliaires.

Dans une préparation de l'extrait alcoolique, nous avons eu l'occasion d'observer certains faits intéressants.

En surveillant soigneusement la concentration dans le vide, nous avons remarqué à un moment donné, lorsque la masse était en consistance sirupeuse, le dépôt de grumeaux blancs, volumineux, assez abondants, tranchant fortement sur la couleur jaune foncé de la liqueur-mère. Ces grumeaux sont séparés par filtration de l'extrait alcoolique concentré. On les lave à plusieurs reprises avec une petite quantité d'alcool à 95° froid et le filtre est desséché dans le vide sulfurique. Le précipité blanc, bien sec, est détaché du filtre.

(1 Korschun et Morgenroth, Ueber die hemolytischen Eigenschaften von Organ-Extrakten. *Berlin, Klin, Woch.*, p. 870, 1902.

(2) Levaditi *C. R. Soc. Biologie*, LXVIII.

Sur une certaine quantité de cette substance, on observe les propriétés suivantes :

Soluble dans l'eau ; légèrement soluble dans le chloroforme.

La solution aqueuse donne les réactions colorées des albuminoïdes (Réactions du biuret, de Millon ; xanthoprotéique, Adamkiewicz) ; mais on s'assure facilement que les substances albuminoïdes sont loin de constituer toute la masse de la substance ; qu'elles sont, au contraire, plaquées sur elle et constituent des impuretés. La substance, très rapidement lavée à l'eau distillée, ne donne plus les réactions colorées des albuminoïdes. Après dessiccation, dans le vide sulfurique, la substance est dissoute dans la plus petite quantité d'eau distillée possible. La solution limpide est placée dans une ampoule à décantation et brassée avec 4 volumes de chloroforme. Après 24 heures de repos, on décante la liqueur inférieure chloroformique dans une capsule de porcelaine. Le chloroforme, évaporé à l'air libre, laisse un très léger dépôt, une substance jaune, butyreuse, d'odeur aromatique. Ce résidu est trop minime pour être soumis à un examen chimique.

La liqueur aqueuse ainsi purifiée est évaporée, d'abord au bain-marie tiède, puis dans le vide sulfurique. La substance blanche est lavée avec de l'éther rectifié, puis avec de l'acétone jusqu'à ce que ces solvants ne laissent plus trace de résidu.

Recherche de l'azote. — On place un fragment de la substance blanche dans un tout petit tube à essai, bien sec, avec une petite quantité de potassium. Le mélange est chauffé sur un bec Bunsen, jusqu'à déflagration : on observe la formation d'un sublimé sur les parties élevées du tube, moins chaudes. On ajoute un peu d'eau distillée et on filtre ; le filtrat jaune est chauffé vers 50° C et on y verse une goutte d'une solution étendue de sulfate ferreux et une goutte d'une solution étendue de chlorure ferrique. Finalement, on ajoute quelques gouttes de potasse et d'acide chlorhydrique. Il se produit un précipité vert-bleuâtre dû au mélange de bleu de Prusse formé et de la coloration jaune initiale de la liqueur. Il s'est donc formé un cyanure ; par suite, présence d'azote dans la substance.

Recherche des acides aminés (groupe du glycocolle). — 1° Un fragment de substance blanche est placé avec un peu de chaux vive

dans un tout petit tube effilé à l'autre extrémité ; on chauffe ; on perçoit une odeur d'amine. Les vapeurs bleuissent fortement un papier rouge de tournesol mouillé présenté à l'extrémité effilée ;

2° Dans un premier verre de montre, on place un peu de substance blanche, un peu d'eau distillée ; et, à la solution, on ajoute 3 gouttes d'acide chlorydrique étendu d'eau (P. E.), puis quelques gouttes d'une solution de chlorure de platine. Le verre de montre est recouvert d'un entonnoir pour le préserver des poussières du laboratoire. Au bout de 48 heures, on observe au microscope la formation de beaux cristaux octaédriques, à contours d'une netteté parfaite ;

3° Dans un deuxième verre de montre, on dispose quelques gouttes de la solution aqueuse de la substance et quelques gouttes d'une solution faible d'acide picrique. Au bout de 48 heures, on décèle au microscope des formes dendritiques, rameuses, allongées, ne rappelant pas la cristallisation de l'acide picrique dans ces conditions. Les acides aminés donnent des chloroplatinates et des picrates cristallisés ;

4° *Action de l'oxyde de cuivre noir, récemment préparé :*

On sait que les solutions d'acides amidés ont la propriété de dissoudre l'oxyde de cuivre noir en donnant une liqueur bleu foncé.

Une solution aqueuse de sulfate de cuivre pur a été précipitée par une petite quantité de lessive de potasse. Le précipité gélatineux obtenu a été bouilli ; au bout d'un certain temps d'ébullition, il s'est formé un précipité noir qui a été jeté sur un filtre. L'oxyde noir a été lavé à l'eau distillée jusqu'à ce que l'eau de lavage ne bleuisse plus le papier rouge de tournesol (absence de potasse).

Un peu de ce précipité, mis à bouillir avec la solution aqueuse de substance, est entré en dissolution, et la liqueur a pris une teinte bleue. A la longue, en présence d'un excès d'oxyde noir de cuivre, la coloration bleue s'est accentuée et est devenue aussi intense que celle de la liqueur de Fehling. Parallèlement, nous avons répété cette réaction avec une solution de glycocolle.

De l'ensemble des recherches précédentes, il résulte que la substance blanche est constituée, en majeure partie, sinon en totalité, par des *acides aminés*.

Recherche de la tyrosine. — La solution aqueuse de substance ne

donne pas la Réaction colorée de Millon : donc, pas de tyrosine.

Détermination du point de fusion. — A l'aide du bloc de Maquenne, le corps fond entre 215° et 220° C, mais il est impossible de déterminer exactement ce point de fusion.

Recherche du pouvoir hémolytique. — Nul.

V. — TRAITEMENT DE L'EXTRAIT ALCOOLIQUE PAR L'ALCOOL ABSOLU BOUILLANT

L'extrait alcoolique dans lequel nous venons de caractériser des acides amidés est traité par de petites quantités d'alcool absolu bouillant, à plusieurs reprises. L'alcool saturé prend une belle teinte rouge très foncé ; on filtre rapidement la liqueur à travers un appareil à filtrations chaudes. On épuise ainsi par l'alcool absolu bouillant jusqu'à ce que la liqueur filtrée n'ait plus qu'une très légère teinte jaune paille. Une assez grande partie de l'extrait alcoolique n'entre pas en solution ; il se rassemble sous forme d'une masse blanc-jaunâtre.

A. — *Partie soluble dans l'alcool absolu bouillant.* — La solution rouge est concentrée, dans le vide, à une température maxima de 30° C.

Recherche du phosphore. — Elle est positive.

Recherche du pouvoir hémolytique :

Tube N° 1 : témoin : XX gouttes de purée globulaire de Cheval lavée + V gouttes d'eau physiologique.

Tube N° 2 : XX gouttes de la purée globulaire précédente + 5 gouttes de solution d'extrait dans l'eau physiologique.

Il y a hémolyse totale au bout d'une demi-heure, à l'étuve, à 37° C.

L'extrait est délayé dans de l'eau distillée. L'émulsion rougeâtre est brassée, dans une ampoule à décantation, avec du chloroforme. Après un repos suffisant, on décante la couche inférieure chloroformique, légèrement jaunâtre. La liqueur aqueuse est traitée une nouvelle fois par du chloroforme. Les solutions chloroformiques réunies sont évaporées à l'air libre ; on obtient ainsi un résidu

jaune foncé, d'aspect butyreux. Ce résidu est soluble dans l'éther, l'acétone ; il noircit, exposé aux vapeurs d'acide osmique. On y recherche les graisses de la façon suivante :

Ce résidu est émulsionné dans de l'eau distillée ; on chauffe et on ajoute un peu de lessive de soude, en ayant soin d'agiter constamment le mélange. La substance disparaît et le liquide chaud répand une odeur savonneuse. A la solution, on ajoute une solution étendue de chlorure de baryum, par petites portions. Il se fait un précipité blanc. Mais la lessive de soude renferme toujours un peu de carbonate de soude, et il s'est produit une quantité correspondante de carbonate de baryte insoluble. Le liquide est filtré et le précipité blanc jeté sur le filtre. Le filtre est desséché avec son contenu dans le vide sulfurique, puis introduit dans un ballon avec un certain volume d'éther à 65°;— on agite de façon à bien répandre le précipité dans l'éther et on ajoute quelques gouttes d'acide sulfurique. Il se fait un précipité de sulfate de baryte insoluble. La solution éthérée est évaporée dans une capsule de porcelaine, à l'air libre ; il reste une substance jaune, oléagineuse, d'odeur butyrique. Nous y avons constaté la présence d'*acide butyrique* en chauffant un peu de résidu avec de l'alcool absolu et SO^4H^2 concentré ; il s'est dégagé une odeur agréable, très caractéristique, de *butyrate d'éthyle* (essence d'ananas).

Donc, malgré tous les soins apportés à l'épuisement initial de la pulpe de Vers par l'éther, une petite partie de graisses a échappé au traitement.

La couche aqueuse, supérieure, séparée du liquide chloroformique, est évaporée, au bain-marie, en consistance sirupeuse. Le liquide épais, rouge-foncé, qui en résulte est épuisé par de l'éther rectifié. Les solutions éthérées abandonnent par évaporation dans une capsule de porcelaine une substance huileuse, jaune citron. Placée dans le vide sulfurique, cette huile se concrète, au bout de trois à quatre jours, en une masse cristalline hygroscopique.

Au microscope, les cristaux se présentent sous la forme de prismes rectangulaires allongés.

Recherche de l'Azote dans les cristaux. — Positive.

Une portion de la masse cristallisée a été dissoute dans un peu d'eau distillée et la solution a été répartie dans des verres de montre placés sur un papier noir. Les réactifs suivants des alca-

loïdes ont donné des précipités : Réactifs de Bouchardat, de Tanret, de Dragendorff,, de Brücke, l'acide picrique, le tanin, l'iodure double de potassium et de mercure, l'acide silicotungstique, le chlorure d'or. A froid, le chlorure d'or est réduit.

La substance cristallisée appartient donc au groupe des alcaloïdes.

Recherche du pouvoir hémolytique de l'alcaloïde. — Un centigramme est dissous dans 3 grammes d'eau physiologique. V gouttes de cette solution produisent l'hémolyse totale d'une purée globulaire de sang de Cheval (XX gouttes) au bout de 8 à 10 minutes (la dose agissante d'alcaloïde est, dans cette expérience, inférieure à 1 milligramme).

Rendement. — 0 gr. 52 centigrammes d'alcaloïde pour 800 grammes de pulpe de Vers.

Cet énorme pouvoir hémolytique nous fait envisager cet alcaloïde comme une des espèces chimiques les plus importantes du Ver, au point de vue hémolytique. Cette si grande disproportion entre l'effet produit et la quantité de substance qui entre en jeu rappelle l'action typique des toxines et des venins. On sait, par exemple, que 1 gramme de venin de *Naja tripudians* tue 4.000 kilogr. de Lapin.

Or, Kyes et Sachs ont nettement établi que la cholestérine empêche l'hémolyse des globules rouges dans un mélange d'hématies lavées + venin de Cobra. Il était naturel de se demander si ce corps n'aurait pas une action analogue sur l'alcaloïde du Sclérostome. A cet effet, la solution alcaloïdique a été triturée dans un petit mortier de verre avec quelques cristaux de cholestérine pure ; l'émulsion ainsi obtenue a été placée à l'étuve à 37° pendant 3/4 d'heure (ce contact préalable de la cholestérine et de la solution active nous a été recommandé par M. H. Iscovesco).

Tube N° 1 : témoin : XX gouttes de purée globulaire lavée et diluée + V gouttes de solution alcaloïdique.

Tube N° 2 : XX gouttes de purée globulaire précédente + V gouttes de solution alcaloïdique renfermant de la cholestérine.

Les deux tubes sont placés à l'étuve à 37° C.

Résultats. — Dans le tube n° 1, l'hémolyse est totale au bout d'un quart d'heure.

Dans le tube n° 2, l'hémolyse a lieu au bout de deux heures.

Donc, la cholestérine n'a pas d'action empêchante sur l'hémolyse par l'alcaloïde.

Recherches sur la portion aqueuse privée de l'alcaloïde. — L'extrait sirupeux précédent, rouge foncé, d'odeur de viande rôtie, auquel on vient d'enlever l'alcaloïde par l'épuisement éthéré, est soumis aux essais suivants :

Recherche du pouvoir hémolytique. — V gouttes de solution hémolysent complètement XX gouttes de purée globulaire de sang de Cheval lavée et diluée, au bout de deux heures.

1° Une partie de l'extrait est dissoute dans l'eau distillée ; la solution est traitée par les réactifs suivants :

Bichlorure de mercure : précipité abondant.
Iodure double de potassium et de mercure + acide acétique : précipité.
Acide picrique : précipité.
Acide phosphotungstique : précipité.
Acide silicotungstique : précipité,
Acide phosphomolybdique : précipité.
Réactif de Bouchardat : précipité brun-marron.
Action sur la liqueur de Fehling : la solution extractive réduit la liqueur de Fehling sans précipitation d'oxyde de cuivre ; à la longue, il se forme un dépôt blanc floconneux.

Action sur le sous-nitrate de Bismuth, en présence d'alcali :
Il n'y a pas de réduction du sel de bismuth.

Ces deux dernières réactions nous mettent sur la voie des *bases créatiniques* si bien étudiées par M. le Professeur A. Gautier, car la réduction de la liqueur de Fehling ne peut être attribuée à du glucose. L'aldéhyde glucose réduit les sels de bismuth, tandis que les bases créatiniques sont sans action sur sur ces sels et réduisent la liqueur de Fehling.

Réactions caractéristiques des bases créatiniques

Réaction de Weyl. — On ajoute à la solution aqueuse quelques gouttes d'une solution à 1 p. 1000 de nitro-prussiate de soude, quelques gouttes de soude à 1 p. 100. La réaction a été positive : la solution s'est colorée en rouge rubis et a viré au jaune assez rapidement.

Mais cette réaction n'est pas spécifique, car elle est également donnée par l'acétone. Il est donc indispensable d'appliquer les autres réactions des bases créatiniques.

Réaction de Jaffé. — On ajoute à la solution aqueuse une solution d'acide picrique et quelques gouttes de soude à 1 p. 100. La réaction a été positive : il s'est produit une belle coloration rouge. (Folin s'est basé sur les différences d'intensité de cette coloration pour établir son dosage colorimétrique.) Nous avons reproduit plusieurs fois la réaction de Jaffé.

Sur les conseils de M. le Professeur A. Gautier, nous avons traité une solution alcoolique (alcool à 95°) de l'extrait par une solution alcoolique de chlorure de zinc de d = 1.2 (quelques gouttes). Le tube à essai a été placé dans de l'eau froide, et, au bout de 8 jours de repos, le dépôt qui s'est formé dans le tube a été examiné au microscope, on a observé de *rares*, mais caractéristiques îlots d'aiguilles très fines (chlorure double de zinc et de créatinine).

La réduction de la liqueur de Fehling, les réactions de Weyl et Jaffé, la précipitation par la solution alcoolique de chlorure de zinc, nous font admettre l'existence de *bases créatiniques* dans l'extrait alcoolique.

D'ailleurs, la créatinine, la crusocréatinine (1) et la *xanthocréatinine* d'Armand Gautier précipitent également par le sublimé corrosif les acides phosphotungstique et phosphomolybdique ;

2° La deuxième portion de l'extrait sirupeux est amenée, dans le vide sulfurique en consistance de miel épais, puis est successivement épuisée par le chloroforme, l'éther et l'acétone. Ces trois véhicules enlèvent très peu de substance à l'extrait. La pâte blanc-jaunâtre ainsi purifiée est desséchée dans le vide sulfurique.

Recherche du pouvoir hémolytique. — V gouttes de solution de cette pâte dans l'eau physiologique hémolysent totalement XX gouttes de purée globulaire lavée et diluée (1 partie de purée globulaire pour 20 parties d'eau physiologique) au bout d'une demi-heure.

Nous avons vu plus haut que les extraits acétoniques de parasites n'hémolysaient pas (les substances hémolysantes du Ver sont

(1) A. Gautier, *Leçons de Chimie biologique normale et pathologique*, p. 218, 1897.

insolubles dans l'acétone) ; cette remarque nous a amené à traiter la solution aqueuse de l'extrait très hémolytique par un grand excès d'acétone. Il se fait un précipité très abondant. Par le repos, il se dépose une substance blanche que l'on recueille sur un filtre. Cette substance blanche est redissoute dans une petite quantité d'eau distillée et la solution est à nouveau traitée par un grand excès d'acétone.

Au bout de 4 heures, le précipité est complètement rassemblé et le liquide surnageant ne précipite plus par l'acétone. Le liquide est décanté et le précipité est jeté sur un filtre. Le filtre est desséché dans le vide sulfurique. On obtient ainsi des pellicules jaune pâle, d'odeur rappelant assez celle des lécithines.

Sur le verre, cette substance laisse une trace grasse, cireuse.

Recherche du Phosphore. — Elle est positive.

Recherche des Albuminoïdes :

a). — *Réactions de coloration.* — Les quatre réactions caractéristiques du biuret, de Millon ; xanthoprotéique, d'Adamkiewicz, sont négatives. Seule, l'absence de réaction du biuret exclut la présence dans la substance d'albumines et de nucléoprotéides.

b). — *Réactions de précipitation.* — Les réactifs de Tanret, de Dragendorff, le tanin, les acides silicotungstique et phosphomolybdique donnent avec la solution aqueuse des précipités abondants.

La substance précédente est donc de *nature alcaloïdique*. De plus, la substance en solution éthéro-alcoolique précipite par une solution alcoolique de chlorure de cadmium ; en solution alcoolique, elle donne un précipité avec une solution alcoolique de chlorure de platine.

Les caractères précédents rapprochent cette substance de certains *lipoïdes phosphorés*. Strecker a montré que l'on pouvait précipiter les phosphatides de leurs solutions au moyen des chlorures de platine et de cadmium et Tudischum a constaté que certains lipoïdes phosphorés, tels que la *céphaline*, la *paramyéline*, *l'amidomyéline* étaient également précipités par les chlorures de cadmium et de platine

Recherche du pouvoir hémolytique. — V gouttes de solution dans l'eau physiologique hémolysent complètement XX gouttes de purée

globulaire de sang de Cheval en vingt minutes. Cette substance est donc *très active*.

B. — *Partie insoluble dans l'alcool absolu bouillant.* — L'extrait alcoolique non dissous par l'alcool absolu bouillant est repris par de l'alcool à 90°. Au bout de 24 heures, la dissolution est complète. Cet extrait alcoolique est évaporé dans le vide à une température maxima de 40° C.

L'extrait pâteux obtenu *ne renferme pas de phosphore. L'alcool absolu bouillant a donc enlevé toutes les substances phosphorées.*

L'extrait est redissous dans une petite quantité d'alcool à 90° froid ; la solution précipite par l'éther, par l'acétone. On la traite par un excès d'éther. Le précipité recueilli sur un filtre est desséché dans le vide ; la liqueur éthéro-alcoolique est évaporée.

Essais sur la substance précipitée par l'éther. — La solution dans l'eau précipite par : *l'acide picrique, les réactifs de Tanret, de Brücke, de Bouchardat, de Dragendorff, les acides phosphotungstique, phosphomolybdique, le bichlorure de mercure.* Mais la réaction du biuret est *négative* et son absence exclut la présence des albumines et des nucléoprotéides ; il en est de même des réactions de Weyl et de Jaffé (absence de leucomaïnes créatiniques).

Ces réactions nous ont fait penser à l'existence possible des *bases puriques* (leucomaïnes xanthiques de A. Gautier). En effet, les bases xanthiques précipitent par les acides phosphotungstique et phosphomolybdique ; l'acide picrique précipite la *guanine*, l'*hypoxanthine*, la *paraxanthine*. Kerner a montré que l'iodure de potassium ioduré donne un précipité brun-rouge avec la *guanine*, la *xanthine* et l'*hypoxanthine*.

Le bichlorure de mercure donne avec les bases xanthiques un précipité cristallin de sel double.

Nous avons alors effectué les réactions suivantes :

Réaction de Weidel. — On fait bouillir un peu de substance avec quelques gouttes d'acide chlorhydrique et quelques cristaux de chlorate de potasse. Le produit est évaporé à sec, au bain-marie, et la capsule est placée sous une cloche légèrement imprégnée d'ammoniaque ; il ne s'est pas produit les teintes rose, puis rouge, puis pourpre caractéristiques de la xanthine et des homologues de la xanthine : hétéroxanthine, paraxanthine.

Réaction de la murexide.— On chauffe dans une petite capsule, au bain-marie, quelques gouttes de solution aqueuse additionnées de quelques gouttes d'acide azotique. Sur le résidu d'évaporation de couleur jaunâtre, on verse une goutte d'ammoniaque : il se fait une coloration rouge.

Dans un autre essai, nous avons remplacé l'ammoniaque par de la potasse ; le résidu rouge-violet a viré au bleu indigo par dessiccation absolue.

Cette réaction positive indique la présence de *bases xanthiques* dans la substance précipitée par l'éther.

Essais sur la solution éthéro-alcoolique. — Cette solution évaporée abandonne un léger résidu blanc amorphe, d'odeur forte, rappelant un peu celle du géranium rosat.

Peu soluble dans l'eau et dans l'alcool à 90°.

La solution alcoolique précipite par *l'iodure double de potassium et de mercure, l'iodure double de potassium et de bismuth, l'acide picrique, le tanin, l'acide phosphomolybdique.*

Recherche du phosphore. — Négative.

Réaction du biuret. — Négative.

Les réactions alcaloïdiques et l'odeur forte, agréable, de ce produit nous le fait ranger dans le groupe des *Ptomaïnes*, si bien étudié et presque entièrement édifié par A. Gautier.

Recherche du pouvoir hémolytique. — La ptomaïne provoque l'hémolyse totale d'une purée globulaire de sang de Cheval lavée et diluée au bout de deux heures.

La petite quantité de matière que nous avons obtenue ne nous a pas permis d'aller plus avant dans l'étude chimique de ce corps.

RECHERCHES SUR LA COMPOSITION CHIMIQUE DES TÉGUMENTS

Le Professeur R. Blanchard a montré, en 1879, que la plupart des Nématodes sont entourés d'une épaisse cuticule chitinoïde (1) qui les protège efficacement contre les agents chimiques. Dans les cellules mères des Echinocoques, Lücke a démontré la présence d'une substance identique à la chitine (2).

Cependant, d'après Ad. Reichard, la cuticule serait formée d'une substance albuminoïde chez les Ascarides, les Géphyriens (Sipunculides) et les Oligochètes (Lumbricus); chez les Hirudinées, elle serait constituée par de la vraie chitine (3).

D'autre part, D. H. Weister, qui a publié dernièrement une intéressante monographie sur la chitine, n'a rencontré cette substance, parmi les vers, que chez les Annélides ; mais, contrairement aux faits avancés par Reichard, jamais la chitine ne se rencontre dans les *téguments* de ces Vers. On ne la décèle que dans les soies, les tentacules et quelquefois l'intestin. Devant ces résultats discordants, nous avons cru intéressant de soumettre à l'analyse chimique les téguments du *Sclerostomum equinum.*

Recherche de la chitine. — Avant de nous livrer à cette recherche, nous avons rassemblé le plus possible les documents épars dans un certain nombre de publications afin de pouvoir appliquer quelques réactions générales, caractéristiques.

Staedeler, en faisant bouillir les carapaces des *Ecrevisses* avec SO^4 H^2 étendu, pendant plusieurs heures, a obtenu un liquide renfermant de l'*ammoniaque* et un *sucre amorphe* réduisant le tartrate cupro-potassique (4). L'acide sulfurique concentré dissout la chitine ; la solution étant diluée et portée à l'ébullition, on

(1) R. Blanchard, Sur la préparation et la conservation des organismes inférieurs, *Revue internationale des Sciences*, III, p. 245, 1879.

(2) Lücke, *Arch. f. path. Anat.*, XIX, p. 189.

(3) Ad. Reichard, *Ueber Cuticular und Gerüst-Substanzen bei Wirbellosen Tieren.* Heidelberg, in-8° de 46 pages, 1902.

(4) Staedeler, *Ann. der Chemie und Pharm.*, CXI, p. 12.

obtient du *sucre de raisin* $C^6\ H^{12}\ O^6$ et *de l'ammoniaque* (1). La chitine des *Coléoptères* est soluble dans les acides sulfurique, chlorhydrique, azotique concentrés (2). Les acides chlorydrique et azotique concentrés dissolvent la chitine sans coloration ; les solutions neutralisées par l'ammoniaque et traitées par le tanin donnent lieu à un précipité abondant (3). Parmi les produits de décompotion sous l'influence de HCl concentré, il faut signaler le *chlorhydrate de glucosamine*, facilement cristallisable, de *l'acide acétique* et de petites quantités d'autres acides de la série grasse (4). L'acide acétique se forme également dans l action de l'acide azotique concentré sur la chitine. Ledderhose a obtenu le premier la glucosamine par la réaction de l'acide chlorhydrique concentré sur la chitine. Il assigne à la chitine la formule $C^{15}\ H^{26}\ Az^2\ O^{10}$. Par l'hydrolyse, cette molécule se scinde en *glucosamine* et *acide acétique* (5). Schmiedeberg considère la chitine comme étant un *éther acétylacétique de la glucosamine*. Suivant Péligot, la chitine des vers à soie renfermerait un peu de cellulose (6). Le réactif de Schweitzer, dissolvant de la cellulose, dissout une petite quantité de chitine des hannetons.

D'après Hammarsten, la trypsine semble sans action sur la chitine (7). Krawkow admet l'existence de plusieurs chitines différentes, suivant les espèces animales d'où elles proviennent. Pour lui, les chitines seraient des dérivés amidés des différents hydrates de carbone : glucose, glycogène, dextrine, etc. C'est l'opinion de Sundwick, qui représente la chitine sous la formule :

$$C^{60}\ H^{100}\ Az^8\ O^{38} + n\ H^2\ O,\ n \text{ variant entre 1 et 4.}$$

Récemment, D.-H. Wester a mis au point (1) nos connaissances actuelles sur cette substance.

Voici un résumé succinct de son fort intéressant travail :

La chitine est un corps azoté incolore, amorphe, insoluble dans

(1) Ad. Würtz, *Dictionnaire de Chimie*, Article chitine.
(2) *Ibidem*, t. II, p. 387.
(3) Gorup-Besanez, *Chimie physiologique*, I, p. 258.
(4) *Ibidem*.
(5) Ledderhose, *Zeitsch. f. phys. Chemie*, p. 213, 1878.
(6) *C. R. Acad. Sciences*, XLVII, p. 1034.
(7) Hammarsten, Lehrbuch der Physiologischen Chemie, p. 81, 120, 685.
(8) D H. Wester, *Arch. der Pharm.*, p. 282, 1909.

les solvants habituels. *A chaud, sous l'influence des acides forts, elle fournit un sucre aminé : la glucosamine*, et de *l'acide acétique*.

Toutes les chitines *sont identiques*, quelle que soit leur origine : chitine de la *Pezize*, chitines de l'*ergot de seigle*, des *Insectes* et des *Brachiopodes*. Elles fournissent les mêmes dérivés et leur teneur en azote est la même : de 6,11 à 6,39 p. 100.

La chitine est soluble dans les acides concentrés ; elle n'est pas attaquée par les sucs gastrique et pancréatique et se retrouve dans les fèces.

Expériences sur les téguments du « Sclerostomum equinum ». — Avant de soumettre les cuticules à l'action des divers agents chimiques et physiologiques, il était indispensable de les obtenir dans le plus grand état de pureté possible.

A cet effet, nous avons utilisé les enveloppes provenant des traitements successifs de la pulpe des Vers par l'éther rectifié et par l'eau distillée chaude. Nous avons vu précédemment que les cuticules résistent, en grande partie, à l'action mécanique du mortier. La trituration exprime les sucs du Ver et l'enveloppe reste soit entière, soit le plus souvent, sous forme de fragments cylindriques, blancs, facilement reconnaissables. La pulpe est délayée dans une grande quantité d'eau distillée et les enveloppes ou fragments d'enveloppes sont soigneusement recueillis avec des pinces. C'est un travail de patience, mais nécessaire si l'on veut opérer sur un produit pur. Les cuticules sont successivement lavées à l'eau physiologique et à l'eau distillée, puis séchées entre des doubles de papier-filtre. Ensuite, on les lave à l'alcool à 90° et à l'éther rectifié. On les dessèche une dernière fois sur le papier à filtre blanc.

I. Action des acides concentrés, purs, a froid (température du laboratoire)

a. *Acide sulfurique.* — Au bout de 26 heures de contact, les enveloppes sont entières. Après 48 heures, on observe une très légère carbonisation, et, au bout de 72 heures, l'attaque est à peine sensible. Après 6 jours de macération, on constate une légère dissolution et l'acide a pris une teinte brune. Cette *grande résistance* des cuticules à l'action de SO^4H^2 est intéressante à noter.

On sait, en effet, que les chitines des Crustacés et des Coléoptères sont solubles dans cet acide concentré.

b. *Acide chlorhydrique.* — La dissolution des téguments est complète après 17 heures de contact et la liqueur a pris une couleur brun-clair. La chitine des Crustacés est également soluble dans HCl concentré pur, mais la dissolution est incolore (1).

c. *Acide azotique.* — Les téguments prennent rapidement une teinte jaune-paille. L'attaque est complète au bout de 17 heures : la dissolution a pris une teinte jaune. Nous verrons plus loin que cette coloration est due à la réaction xanthoprotéique.

II. — Action des acides minéraux a l'ébullition

Nous avons vu plus haut que Ledderhose a obtenu de la glucosamine en faisant agir de l'acide chlorhydrique concentré sur la chitine. Le chlorhydrate de glucosamine se présente sous forme de cristaux incolores, inaltérables, très solubles dans l'eau, très peu solubles dans l'alcool, insolubles dans l'éther. La glucosamine est réductrice comme les glucoses et donne avec la phénylhydrazine la même osazone ; mais elle ne fermente pas.

Recherche de la glucosamine. — Nous avons suivi la technique indiquée par Morel (2) :

20 grammes de cuticules sont chauffées avec 100 cc d'acide chlorhydrique concentré et 900 cc d'eau distillée pendant 4 heures, au bain-marie. Tout se dissout. La solution est concentrée doucement au bain-marie et on laisse refroidir le liquide épais et brun. Au bout de 8 jours, il ne s'est pas formé de cristaux. Dans ces conditions, la glucosamine cristallise.

D'autre part, nous avons recherché si le liquide concentré réduisait la solution de Fehling. Pour cela, le liquide a été préalablement alcalinisé par la soude. Il y a eu décoloration du tartrate cupro-potassique, mais pas de précipitation d'oxydule de cuivre Cu^2O après un repos suffisant. Cependant, il est possible que l'oxyde formé, au lieu de se précipiter, ait été entraîné en solution

(1) Gorup-Besanez, *Chimie physiologique*, I, p. 258.

(2) A. Morel, *Précis de Technique chimique à l'usage des laboratoires médicaux*, p. 389, 1909.

à la faveur d'une substance quelconque, de nature inconnue. Nous avons alors recherché l'oxyde de cuivre en appliquant ici le procédé de réduction du chlorure ferrique par le chlorure cuivreux. Dans un tube à essai, on dilue la liqueur avec de l'acide chlorydrique : s'il y a de l'oxyde de cuivre en dissolution, il se fait du chlorure cuivreux $Cu^2\ Cl^2$; on ajoute ensuite une goutte de chlorure ferrique et quelques gouttes d'une solution étendue de ferricyanure de potassium. Le chlorure cuivreux fait passer le chlorure ferrique à l'état de chlorure ferreux qui donne un *précipité bleu de Turnbull* avec le prussiate rouge. Nous n'avons pas obtenu ce précipité : donc, pas de réduction et pas de glucosamine. Enfin, pour compléter notre conviction, nous avons essayé de provoquer dans la liqueur d'hydrolyse la formation d'*osazone*. Cette liqueur a été chauffée pendant 30 minutes sur un bain-marie bouillant avec du chlorhydrate de phénylhydrazine pur, de l'acétate de soude et de l'acide acétique. Puis, la liqueur a été abandonnée au repos pendant 12 heures : pas de séparation de cristaux jaunes caractéristiques. Une expérience parallèle, témoin, a été pratiquée avec une solution très étendue de glucose. Donc, l'hydrolyse de téguments ne provoque pas la production de glycosamine.

Recherche de l'acide acétique. — On sait que cet acide se produit dans l'hydrolyse de la chitine.

La solution provenant de l'action de l'acide chlorhydrique dilué sur les téguments est neutralisée par du carbonate de soude pur, puis filtrée. Le filtrat est évaporé à siccité. Le résidu est chauffé avec un peu d'anhydride arsénieux ; il ne se forme pas d'oxyde de cacodyle, d'odeur caractéristique. Donc, pas d'acide acétique. A trois reprises différentes, nous avons obtenu un résultat négatif.

III. Action des alcalis concentrés, a froid (température du laboratoire)

a. *Lessive de potasse, à 36° B.* — Au bout de 2 heures de contact, on constate la désagrégation des enveloppes et le liquide mousse abondamment par l'agitation.

Après 5 jours de macération, la désagrégation est complète ; les téguments sont réduits à l'état de menus fragments en suspension dans une liqueur jaune.

b. *Lessive de soude, à 36° B.* — L'action est analogue à celle de la potasse.

c. *Ammoniaque pure.* — Aucune action au bout de 4 jours.

IV. — Action des alcalis concentrés, a l'ébullition

Les lessives concentrées de potasse et de soude dissolvent assez rapidement les cuticules. Au contraire, celles-ci restent intactes en présence de l'ammoniaque bouillante.

V. — Action du réactif de Schweitzer (oxyde de cuivre ammoniacal)

Ce réactif a été préparé suivant le procédé indiqué par Péligot : on agite pendant assez longtemps de la tournure de cuivre avec de l'ammoniaque concentrée, au contact de l'air. Au bout de 2 heures, la liqueur bleue, très foncée, est décantée.

Après 12 heures de macération, nous avons obtenu une action destructive analogue à celle de la potasse. Un contact de 20 heures a solubilisé la plus grande partie des téguments. L'attaque ne peut être attribuée ici à l'ammoniaque du réactif, car nous avons vu plus haut l'indifférence absolue de cet agent chimique à l'égard des cuticules. Dans une expérience, le réactif de Schweitzer a dissous 2 gr. 45 d'enveloppes sur un poids primitif de 2 gr. 80, après 8 heures de contact. Cette extrême solubilité dans l'oxyde de cuivre ammoniacal différencie nettement le tégument du sclérostome de la chitine (la chitine des Hannetons est peu soluble dans ce réactif). De plus, l'essai suivant les éloigne encore davantage : la solution des téguments du sclérostome par le réactif de Schweitzer ne précipite pas par addition d'acide chlorhydrique. Dans le cas de la chitine du Hanneton, il y a précipitation de flocons légers.

VI. — Action de la trypsine sur les téguments

Dans un flacon *a*, à large ouverture et fermé à l'émeri, on met en présence, dans de l'eau thymolée : des cuticules bien blanches,

du ferment trypsine et quelques gouttes d'une solution de carbonate de soude à 2 p. 1000.

Un deuxième flacon *b*, témoin, renferme le même poids de cuticules, la même quantité d'alcali et le même volume d'eau thymolée.

Les deux flacons sont placés à l'étuve, à la température constante de 37° C.

Il est indispensable de produire ces digestions artificielles dans un milieu antiseptique : on sait qu un certain nombre de microorganismes sécrètent des ferments protéolytiques. Le chloroforme, le toluène, l'acide cyanhydrique, le naphtol, le phénol ordinaire, le thymol maintiennent la stérilité du milieu et n'entravent pas l'action fermentaire (1).

Résultat. — Au bout de six heures, la digestion des cuticules est fort avancée ; *elle est complète* au bout de 8 heures d'étuve. Le flacon témoin n'a pas varié ; les téguments sont intacts. Dans 5 expériences sucessives, la trypsine a digéré les enveloppes dans un temps variant de 6 à 8 heures.

Examen du liquide de digestion

La liqueur est filtrée, puis portée à l'ébullition ; on obtient un léger coagulùm ; on filtre à nouveau et, dans le filtrat limpide, les peptones sont recherchées à l'aide des réactifs suivants : *Biuret, Esbach, Tanret, acide trichloroacétique.* Toutes les réactions sont nettement positives, les précipités obtenus, *à froid,* par la solution d'acide picrique (Esbach), le réactif si sensible de Tanret, l'acide trichloroacétique se dissolvent, *en partie, à chaud.* Par le refroidissement de la liqueur chaude *filtrée*, on obtient, à nouveau, de légers précipités par le refroidissement.

Il résulte de ce qui précède que les produits de digestion renferment *des peptones.*

Mais la coagulation de la liqueur, à l'ébullition, nous indique la présence, à côté des peptones, de certaines albumines (la solution de peptones ne coagule pas par la chaleur).

Dans un liquide de digestion trypsique, on recherche *directement*

(1) A. Gautier, *Leçons de Chimie biologique,* p. 545.

les albumines dans le filtrat à l'aide des réactifs suivants : *Biuret, Tanret, Esbach, acide trichloroacétique, Millon, xanthoprotéique, Adamkiewicz, alcool, acide azotique.*

Toutes ces réactions sont positives, et notamment celles du *Millon, du biuret, xanthoprotéique, d'Adamkiewicz*, sont fortement accusées.

L'addition d'*eau de Brome*, par gouttes, dans la liqueur de digestion décèle la présence du *tryptophane* (ou *protéine chromogène*). On sait que le *tryptophane* se produit dans la dislocation moléculaire avancée de l'albumine sous l'influence de la trypsine, à côté des *bases hexoniques* de Kossel *(lysine, histidine, arginine)* et des *acides amidés : leucine, tyrosine.*

Il existe donc, *à côté des peptones*, des substances albuminoïdes dans la liqueur de digestion, et les cuticules renferment des albumines riches en *tyrosine* et en *tryptophane.*

On a recherché le point de coagulation des *albumines solubles* produites, en même temps que *les peptones*, par l'action hydrolysante de la trypsine sur les cuticules : le liquide coagule *à 70° C.*

Dans une autre série d'expériences, nous avons constaté que le liquide de digestion précipite, à froid, par *l'alcool, l'acide acétique* (le précipité est insoluble dans un excès de réactif), *l'acide chlorhydrique* (le précipité est également insoluble dans un excès de réactif), *l'acide azotique* (abondant précipité insoluble dans un excès d'acide). Or, les *mucines* précipitent également par l'alcool et par l'acide acétique, à froid, et ce dernier précipité est aussi insoluble dans un excès de réactif. Le produit de digestion présente donc deux caractères distinctifs des mucines ; mais, avec ces derniers corps, les précipités obtenus par les acides chlorhydrique et azotique sont *solubles* dans un excès d'acide. Néanmoins, pour être rigoureux, nous devions rechercher la présence des mucines dans le liquide de digestion trypsique.

A cet effet, la liqueur est traitée par de l'eau acétique jusqu'au maximum de précipitation.

Le précipité est jeté sur un filtre, puis lavé à plusieurs reprises à l'eau acétique.

Une partie du précipité est calcinée avec de l'azotate de sodium et du carbonate de sodium *purs* ; le résidu est repris par de l'acide azotique et une solution concentrée de molybdate d'ammoniaque :

on obtient un précipité jaune ; d'où présence de *phosphore* L'autre partie du précipité est hydrolysée, au bain-marie bouillant, avec de l'acide chlorhydrique à 2 °/₀ : on n'obtient pas de *sucre réducteur* (recherche avec la liqueur de Fehling, après neutralisation et alcalinisation de la liqueur). Or, les mucines *ne renferment pas* de phosphore et sont dédoublées, par la chaleur en présence des acides minéraux étendus, en albuminoïdes et en *sucre réducteur*. La liqueur provenant de la digestion des cuticules par la trypsine ne renferme donc pas *de mucines*.

De l'ensemble de toutes les expériences précédentes, il résulte que les cuticules de *Sclerostomum equinum* se caractérisent par les trois propriétés essentielles suivantes :

1° *Grande solubilité dans l'oxyde de cuivre ammoniacal* ;
2° *Résistance à l'action de l'acide sulfurique concentré* ;
3° *Facile digestion par la trypsine.*

De plus, ces cuticules ne donnent pas, à l'hydrolyse, de la glucosamine, ni de l'acide acétique. *Elles ne renferment donc pas de chitine.* Les cuticules du Ver étant aisément digérées par la trypsine, il est infiniment probable que la résistance du parasite vivant, à l'action des enzymes digestives dans le tube intestinal, est due à l'existence d'une *antikinase,* d'une *antisensibilisatrice physiologique* (1). On sait que les parasites peuvent subsister plusieurs jours, *in vitro*, dans des milieux renfermant des ferments protéolytiques. En 1878, Léon Fredericq a constaté le fait chez l'*Ascaris marginata du* Chien placé dans une solution de suc pancréatique. A ce sujet, M. le Professeur agrégé Brumpt nous a fait part de ses observations personnelles : la *trichine* vivante n'est pas attaquée par le suc gastrique.

Enfin, nous avons fréquemment observé la présence du *Bothriocephalus punctatus* daus les tubes pyloriques du *Cottus bubalis ;* or, nous avons établi que ces organes sécrétaient de la trypsine (2).

Recherche directe des albumines dans les cuticules. — Les cuticules bien blanches ont été réparties dans quatre petits tubes à essai :

(1) A. Dastre et Stassano, Existence d'une antikinase chez les parasites intestinaux. *C. R. Soc. Biol.*, 21 janvier 1903.

(2) Th. Bondouy, *Du rôle du tube pylorique dans la digestion chez les Téléostéens*, Thèse, Ecole sup. de Pharmacie, p. 33.

Dans le 1er, on verse du *Réactif de Millon ;*

Dans le 2e, de la *lessive de potasse*, puis *quelques gouttes* d'une solution de *sulfate de cuivre* étendue ;

Dans le 3e, de *l'acide azotique ;*

Dans le 4e, de *l'acide acétique* et de *l'acide sulfurique.*

Au bout de 3 heures de contact, les téguments sont colorés.

Dans le 1er tube, *en rouge-cerise* (réaction de Millon) ;

Dans le 2e tube, *en violet foncé* (réaction du biuret) ;

Dans le 3e tube, *en jaune* (réaction xanthoprotéique) ;

Dans le 4e tube, *en rose-violet* (réaction d'Adamkiewicz).

Conclusion. — Les téguments du *Sclerostomum equinum* ne renferment pas de chitine ; ils sont constitués par des *albumines complexes* riches en tyrosine et en tryptophane.

RECHERCHE DE LA BILIRUBINE DANS LA PULPE DU «SCLEROSTOMUM EQUINUM»

Ranc a démontré la présence de la bilirubine dans le sérum sanguin du Cheval. En 1907, Bierry et Ranc (1) ont donné un procédé très sensible pour rechercher ce corps dans les liquides qui peuvent en contenir, soit à l'état physiologique, soit à l'état pathologique (dans le sérum humain, le liquide d'ascite, l'urine). Voici en quoi consiste cette méthode :

2 cc de plasma ou de sérum sont additionnés de 4 cc d'alcool à 95°. On agite quelques instants et on filtre. Le filtrat jaune ainsi obtenu est étendu de 3 fois son volume d'eau, puis agité avec 3cc de chloroforme pur et sec. On recueille la couche inférieure chloroformique, qui s'est légèrement teintée en jaune, puis on évapore à siccité dans une capsule de porcelaine. Il reste un résidu rougeâtre contenant de la bilirubine ; ce résidu est repris par du chloroforme pur, qui se colore en jaune d'or. On ajoute alors 2 à 3 gouttes d'une solution de Brome à 0,02 p. 100 dans le chloroforme ; la liqueur jaune devient verte. Dans cette solution chloroformique verte, si on fait tomber une ou deux gouttes d'alcool pur, on a

(1) H. Bierry et A. Ranc, Sur une réaction de la bilirubine. *C. R. Soc. de Biologie*, 7 décembre 1907

immédiatement le passage au bleu intense. Il suffit de promener au-dessus de la surface du liquide bleu la pointe d'un agitateur imprégnée d'ammoniaque pour observer la décoloration instantanée.

Nous avons répété plusieurs fois avec succès la réaction de Bierry et Ranc sur du sérum sanguin de Cheval frais recueilli par nous aux Abattoirs de Vaugirard. Puis, nous l'avons appliquée à la recherche de la bilirubine dans le *Sclerostomum equinum*. A cet effet, la pulpe du parasite, obtenue comme nous l'avons indiqué au début de ce travail, est centrifugée. C'est le liquide rouge surnageant que nous avons employé. Dans plusieurs expériences successives, nous n'avons pas pu déceler la bilirubine dans ce liquide. Ce corps a donc été transformé à l'intérieur du parasite.

CONCLUSIONS

Nos conclusions sont de deux ordres :

A) *D'ordre chimique.* — Nous avons caractérisé dans le *Sclerostomum equinum :*

1° *Des graisses ;*
2° *Des acides gras* (particulièrement de l'acide butyrique) ;
3° *Des savons alcalins ;*
4° *De la mucine ;*
5° *Des albumoses ;*
6° *Des bases puriques et créatiniques ;*
7° *Une ptomaïne ;*
8° *Un alcaloïde cristallisé ;*
9° *Un acide aminé ;*
10° *Une substance amorphe, azotée et phosphorée, non albuminoïde, présentant les réactions de précipitation des alcaloïdes ;*
11° *La cuticule est uniquement constituée par des albuminoïdes et ne renferme pas de chitine.*

B) *D'ordre biologique :*

1° Contrairement aux assertions de WEINBERG, l'extrait alcoolique du parasite possède un grand pouvoir hémolytique ;
2° Le *Sclerostomum equinum* sécrète une lipase qui digère les graisses du sérum de Cheval ;
3° Les savons et les acides gras du parasite ont un pouvoir hémolytique marqué ;
4° Le ferment lipasique joue un rôle actif dans le mécanisme de l'hémolyse. Pour nous, les pouvoirs lipasique et hémolytique du Ver sont intimement liés ;

5° La ptomaïne contribue à l'hémolyse ;

6° L'alcaloïde cristallisé est la substance la plus active du parasite au point de vue hémolytique ;

7° La substance amorphe azotée, phosphorée, alcaloïdique est de beaucoup la substance hémolytique la plus abondante ;

8° La bilirubine du sérum de Cheval est transformée par l'activité cellulaire du parasite.

Vu : le Président de la thèse,

ARMAND GAUTIER.

Vu : le Doyen,

LANDOUZY.

Vu et permis d'imprimer

Le Vice-Recteur de l'Académie de Paris.

LIARD.

Lille. — Imprimerie Centrale, 12, rue Lepelletier.